

A sejtfelszíni FasL és szolubilis vezikula-kötött FasL által indukált sejthalál gátlása és jellemzése

doktori értekezés

Készítette:

Hancz Anikó

ELTE TTK Biológia Doktori Iskola

Immunológia Program

Témavezetők:

Prof. Dr. Sármay Gabriella

Egyetemi tanár

Dr. Koncz Gábor

Tudományos munkatárs

Programvezető:

Prof. Dr. Erdei Anna

Tanszékvezető egyetemi tanár

ELTE TTK Immunológia Tanszék

Budapest, 2012



TARTALOMJEGYZÉK

1.	RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK	4
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1.	AZ APOPTÓZIS	9
2.2.	A FAS RECEPTOR	9
2.3.	A FAS JELÁTVITEL GÁTLÁSA	11
2.4.	LPR, GLD EGEREK TULAJDONSÁGAI	14
2.5.	FAS A B-SEJTEN	15
2.5.1.	<i>A Fas szerepe a germinális centrumban</i>	<i>16</i>
2.5.2.	<i>A Fas-közvetített apoptózis ellen működő túlélő szignálok</i>	<i>18</i>
2.6.	FAS A T-SEJTEN	23
2.6.1.	<i>A FasL formái</i>	<i>24</i>
2.6.2.	<i>A mikrovezikulák</i>	<i>25</i>
2.7.	NEKROPTÓZIS	25
2.7.1.	<i>A RIP1 szerepe</i>	<i>26</i>
3.	CÉLKITŰZÉSEK	29
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	30
4.1.	FELHASZNÁLT OLDATOK	30
4.2.	HASZNÁLT ELLENANYAGOK, SPECIFIKUS REAGENSEK	32
4.2.1.	<i>Sejtfelszíni és intracelluláris fehérjék kimutatásához</i>	<i>32</i>
4.2.2.	<i>Sejthalál indukálásához</i>	<i>33</i>
4.2.3.	<i>Túlélő faktorok, aktivátorok, citokinek</i>	<i>33</i>
4.2.4.	<i>Gátlók</i>	<i>34</i>
4.2.5.	<i>Egyéb reagensek</i>	<i>34</i>
4.3.	SEJTJENYÉSZTÉS	34
4.4.	IMMUNFLUORESZCENS JELŐLÉS FACS ANALÍZISHEZ	35
4.4.1.	<i>Sejtfelszíni fehérje expresszió mérés</i>	<i>35</i>
4.4.2.	<i>Intracelluláris fehérje expresszió mérés</i>	<i>35</i>
4.4.3.	<i>SDS-Page és Western Blot</i>	<i>35</i>
4.5.	SEJTHALÁL INDUKÁLÁSA	36
4.6.	A CITOTOXICITÁS MÉRÉSE	38
4.6.1.	<i>Apoptózis mérése (subG1)</i>	<i>38</i>
4.6.2.	<i>Membránintegritás mérése (PI)</i>	<i>38</i>
4.7.	KONFOKÁLIS MIKROSKÓPIA	38
4.8.	KASZPÁZAKTIVITÁS MÉRÉS	38
4.8.1.	<i>Általános kaszpázaktivitás mérés</i>	<i>38</i>
4.8.2.	<i>Kaspáz-3 aktivitásának mérése</i>	<i>39</i>
5.	EREDMÉNYEK	40
5.1.	A TULÉLÉST SEGÍTŐ ÉS A FAS-KÖZVETÍTETT SEJTHALÁLT KIVÁLTÓ JELEK INTERAKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA B-SEJTENEN	40
5.1.1.	<i>Vizsgálatok humán SKW6.4 B-sejtvonalon</i>	<i>40</i>
5.1.1.1.	<i>Alkalmas B-sejtvonal kiválasztása</i>	<i>40</i>
5.1.1.2.	<i>A BAFFR által közvetített szignál hatása a Fas-közvetített apoptózisra</i>	<i>41</i>
5.1.1.3.	<i>A BAFF hatása az anti-BCR által kiváltott túlélő szignálra</i>	<i>42</i>
5.1.1.4.	<i>A BAFFR-Fas és a BCR-Fas jelpályák interakcióinak molekuláris analízise</i>	<i>43</i>
5.1.2.	<i>Egér A20 B-sejtvonalon végzett vizsgálatok</i>	<i>44</i>
5.1.2.1.	<i>BAFF, CpG ODN és anti-BCR hatása a Fas indukált sejthalálra</i>	<i>44</i>
5.1.2.2.	<i>BAFF-al, CpG ODN-dal és anti-BCR-ral történő kostimuláció hatása a Fas-közvetített apoptózisra</i>	<i>46</i>
5.1.2.3.	<i>A CpG ODN és az anti-BCR indukált túlélés molekuláris mechanizmusa</i>	<i>47</i>
5.2.	SZOLUBILIS VEZIKULA-KÖTÖTT FASL ÁLTAL INDUKÁLT SEJTHALÁL JELLEMZÉSE	50
5.2.1.	<i>PHA-val aktivált sejtek felülszója által indukált sejthalál karakterizálása</i>	<i>50</i>
5.2.2.	<i>A vezikula indukált sejthalál Fas-függése</i>	<i>53</i>
5.2.3.	<i>A felülszóval kiváltott sejthalál enzimatis és molekuláris háttere</i>	<i>55</i>

5.2.3.1.	Z-Vad és katepszin D inhibitor hatása a Vsec indukált sejthalálra.....	55
5.2.3.2.	FADD, kaszpáz-8 és kaszpáz-9 hiányának hatása a vezikula indukált sejthalálra	57
5.2.3.3.	A felülűszó-közvetített sejthalál RIP-függése	61
5.2.4.	<i>A dendritikus sejt szerepe a felülűszó indukált sejthalálban</i>	65
5.2.4.1.	A dendritikus sejt, mint sejtpusztító felülűszót termelő sejt.....	65
5.3.	CPG ₂ ANTI-BCR HATÁSA A VEZIKULA-KÖZVETÍTETT SEJTHALÁLRA	70
6.	MEGBESZÉLÉS	71
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	77
8.	SUMMARY	78
9.	IRODALOMJEGYZÉK	79
10.	PUBLIKÁCIÓS LISTA	90
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	93

1. Rövidítésjegyzék

AICD	activation-induced cell death
ALPS	autoimmune lymphoproliferative syndrome
Apaf	apoptotic protease activating factor
APRIL	a proliferation-inducing ligand
APS	ammonium persulfate
BAFFL	B-cell-activating factor ligand
BAFFR	B-cell-activating factor receptor
BCMA	B cell maturation antigen
BCR	B cell receptor
BD	Becton Dickinson
BIR	Baculovirus Inhibitor of apoptosis protein Repeat
BSA	bovine serum albumin
Btk	Bruton's tyrosine kinase
CARD	caspase activation and recruitment domain
cDC	conventional dendritic cells
cFLIP _L	long cellular FLICE inhibitory protein
CHX	cikloheximide
CpG	cytosine, phosphodiester, guanine
CREB	cAMP response element-binding
CTL	cytotoxic T cell
CYLD	cylindromatosis
D2-R110	bis-L-aspartic acid amide of rhodamine 110
DcR	decoy receptor
DED	death effector domain
DIABLO	direct IAP binding protein with Low pI
DISC	death-inducing signaling complex
DN	double negative
ECL	enhanced chemiluminescence
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ER	endoplasmic reticulum
FACS	fluorescence-activated cell sorting

FADD	Fas associated death domain
FAIM	Fas apoptosis inhibitory molecule
FCS	foetal calf serum
FDC	follicular dendritic cell
FITC	fluorescein isothiocyanate
FLIP	FLICE inhibitory protein
fű	felülülő
GC	germinal center
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HRPO	horseradish peroxidase
HSP	heat shock protein
JNK	c-Jun N-terminal kinase
IAP	inhibitor of apoptosis protein
IFN	interferon
Ig	immunoglobulin
IL	interleukin
IRAK	interleukin-1 receptor associated kinase
IRF	interferon regulatory factor
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MFI	mean fluorescent index
MHC	major histocompatibility complex
mTOR	mammalian target of rapamycin
NF- κ B	nuclear factor κ B
NK	natural killer
NOS	nitric oxide synthase
ODN	oligodeoxynucleotide
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	phosphate buffered saline
pDC	plasmacytoid dendritic cells
PE	phyco-erythrin
PHA	phytohaemagglutinin

PI	propidium iodide
PI3K	phosphatidyl-inositol-3-kinase
Pim	phosphatidylmyo-inositol mannosides
PKC	protein kinase C
PLAD	preligand assembly domain
PMA	phorbol myristic acid
poli(I:C)	synthetic double-stranded RNA polyriboinosinic polyribocytidylic acid
PRR	pattern recognition receptors
RA	rheumatoid arthritis
RHIM	RIP homotypic interaction motif
RIG-1	retinoid-inducible gene 1
RING	really interesting new gene
RIP	receptor interacting protein
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
RNáz	ribonuclease
RPM	revolutions per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
SHM	somatic hypermutation
SLE	systemic lupus erythematosus
SMAC	second mitochondria-derived activator of caspases
SS	Sjögren's syndrome
sup	supernatant
TAB	TGF- β -activated protein kinase 1-binding protein
TACI	transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor
TAK	transforming growth factor- β -activated kinase
TCR	T cell receptor
TEMED	N,N,N,N-tetra-methylethylene diamine
Th	helper T cell
TIR	Toll/interleukin-1 receptor
TLR	Toll-like receptor
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TRADD	tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain

TRAF	TNF-receptor associated factor
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TWB	tris wash buffer
Vsec	secreted vesicle
WT	wild type

2. Irodalmi áttekintés

A többsejtű szervezetek homeosztázisának fenntartásában nélkülözhetetlen a programozott sejthalál folyamata. Ezen mechanizmus talán legtöbbet vizsgált közvetítője a Fas (CD95/Apo1/TNFSR6) sejthalál receptor, melynek szerepe régóta ismert az immunrendszer egyensúlyának fenntartásában. A Fas részt vesz többek között a T-sejtek aktiváció indukált sejthalál folyamatainak szabályozásában, de az érett B-limfocita készlet kialakításában is központi szerepet játszik.

A Fas-közvetített sejthalál felelős a germinális centrumokban, a szomatikus mutációt követően kialakuló nem specifikus, illetve autoreaktív B-sejtek eltávolításáért. A germinális centrumban a B-sejtek apoptózissal elpusztulnak, amennyiben nem érzékelik számukra a B-sejt receptoron (BCR) vagy az antigén specifikus T-sejtekkel kapcsolatot biztosító CD40-en keresztül túlélő jel, mutatva a B-sejtek antigén specificitását. *Összességében az - elsősorban a Fas receptor által közvetített - apoptotikus, illetve a túlélő jelek egyensúlya határozza meg a B-sejtek sorsát* [1, 2]. A germinális centrumban történő Fas-közvetített programozott sejthalál a FasL-ot expresszáló T-sejt és a Fas-t hordozó B-sejt közvetlen kapcsolatán alapul. A T-sejteken kifejeződő FasL fő célpontjai elsősorban azon B-sejtek, melyek antigénprezentációs képességüket megőrzik, de antigén felismerésük megszűnt, vagy csökkent (szomatikus mutáción átesett B-sejtek, kis affinitású B-sejtek, autoreaktív B-sejtek). Egy további lehetőség, hogy az antigént nem felismerő, prezentálni képtelen B-sejtek esetében, ahol a T-sejt/B-sejt kapcsolat sem alakul ki, a sejthalált a FasL egy szekretált formája indukálja. A FasL az NK-, a T-sejtek és egyes tumorok által termelt vezikulumok felszínén is kikerülhet az extracelluláris térbe, amely szekretált forma szintén citotoxicitást közvetít [3].

2.1. Az apoptózis

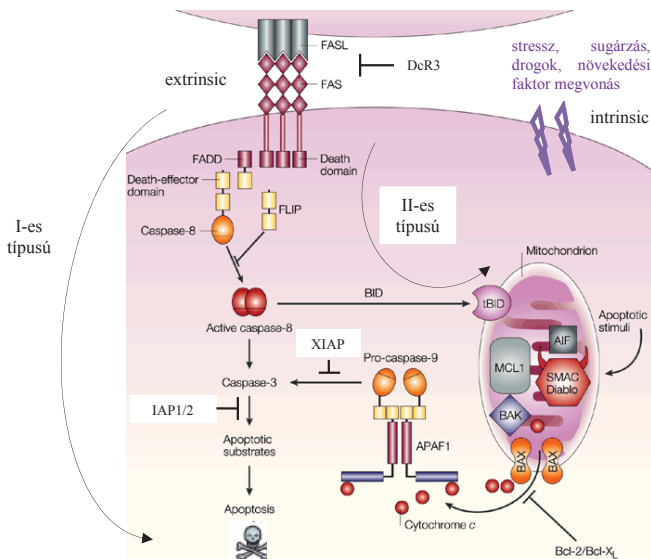
Az apoptózis elengedhetetlen a szervezet egyensúlyának fenntartásához. Az apoptózis szigorúan szabályozott, különböző ingerek által kiváltott, meghatározott program szerint lejárásódó, aktív folyamat. Az indikációt követően a sejtben aktiválódó jelátviteli folyamatok hatására a sejt térfogata csökken, kromatinállománya kondenzálódik, majd a sejtmag fragmentálódik, végül membránnal körülvett apoptotikus testek képződnek. A membránhólyagok lefűződésével a sejt tartalma nem kerül a környezetbe, ezáltal jelentősen csökken a gyulladásos folyamatok beindulásának esélye. A sejtek apoptózisához két mechanizmus vezethet: az extrinsic (külső), illetve az intrinsic (belső) útvonal. Sugárzás, drogok, citokin megvonás, DNS károsodás, stressz, stb. egyaránt a mitokondrium membránjának permeabilizációját okozzák, mely aktiválja az intrinsic kaszkádot. E belső útvonalat főleg a Bcl-2 fehérjecsalád pro- és anti-apoptotikus tagjainak interakciója, egyensúlyja szabályozza. A másik mechanizmust, az extrinsic útvonalat a sejthalál receptorok közvetítik, a receptor és ligandjának interakciója indítja el a jelátvitelt, az apoptózis folyamatát. A legtöbbet vizsgált sejthalál receptor a Fas (CD95, Apo1, TNFSF6).

2.2. A Fas receptor

A Fas a TNFR (tumornekrózis faktor receptor) csoportba tartozó transzmembrán halálreceptor. A TNFR család tagjaira jellemzően ligand kötődéstől függetlenül trimerizálódik, amit a PLAD (preligand assembly domain) szabályoz. A Fas receptor jelátvitelét az 1. ábra mutatja. A FasL kötődését követően a receptor oligomerizálódik, konformációja megváltozik és képessé válik a citoplazmatikus FADD (Fas associated death domain) megkötésére [4, 5]. A jelátviteli kaszkád első lépéseként a FADD C-terminális halál doménje hozzákapcsolódik a Fas intracitoplazmatikus halál doménjéhez (DD death domain). A FADD N-terminális része tartalmaz egy halál-effektor domént (DED), ami a prokaspáz-8 DED doménjével kerül kapcsolatba, miáltal végül kialakul a sejthalál indukáló komplex (DISC). A Fas által egybegyűjtött prokaspáz-8 molekulák közel kerülnek egymáshoz és - mivel a pro forma is rendelkezik egy alacsony proteáz aktivitással - transz-autoproteolízissel hasítják egymást. A hasított, aktív kaszpáz-8 leválik a DISC-ről és további citoplazmatikus target molekulákat hasít, beindítva ezzel a kaszpáz kaszkádot, melynek következtében a sejt elpusztul [2, 6, 7].

A Fas indukált apoptózis két módon folytatódhat. Az I-es típusú apoptózist gyors, intenzív DISC-kialakulás és ezáltal magas aktív kaszpáz-8 szint jellemzi, ami közvetlenül kaszpáz-3 aktivációhoz vezet. Ez az útvonal nem igényli a mitokondriális út aktivációját.

A II-es típusú apoptózis esetében a kaszpáz-8 aktiválódása kevésbé intenzív, így a kaszpáz-8 aktivációja önmagában nem elegendő a kaszpáz-3 hasításához, majd a kaszpáz kaszkád további lépéseinek aktivációjához [2]. A II-es típusú sejthalál út a mitokondriumok aktiválásán keresztül vezet a sejtek pusztulásához. A sejthalál receptorokon keresztül kiváltott II-es típusú sejthalál esetében az aktiválódott kaszpáz-8 hasítja a Bid-et. A hasított Bid - a Bcl-2 család proapoptotikus tagjaként - a mitokondrium membránjához kapcsolódva a Bak proapoptotikus fehérje oligomerizációját okozza, ami a mitokondrium külső membránján pórust képez és a citokróm c felszabadulását eredményezi. A felszabaduló citokróm c-ből, az Apaf-1-ből (apoptotic protease-activating factor 1) és a prokaspáz-9-ből kialakul az apoptoszóma komplexe. Az apoptoszómában a citokróm c az Apaf-1 oligomerizációját okozza, az Apaf-1 a CARD doménjén (caspase activation and recruitment domain) keresztül homológ domén interakcióval a kaszpáz-9 CARD doménjéhez kapcsolódik. Az apoptoszóma kialakulása ezáltal ATP jelenlétében a kaszpáz-9 aktivációját okozza, ami a kaszpáz-3 hasításához vezet. A mitokondrium membrán permeabilitásának növekedése így az effektor kaszpázok kaszkádjának beindítását és a sejt apoptózisát eredményezi [8-12].



1. ábra: A Fas receptor jelátvitel és gátlása

2.3. A Fas jelátvitel gátlása

Az apoptózis szabályozott folyamatának megjelenése szükségszerű velejárója volt a többsejtű élőlények evolúciójának, hiszen a testformák kialakulása, a felesleges, hibás vagy veszélyes sejtek eltávolítása a teljes szervezet épségének érdekében elképzelhetetlen a sejthalál programja nélkül. Amennyire szükséges az apoptózis az említett folyamatok során, ugyanannyira fontos az is, hogy a sejthalál programja gátlható legyen olyankor, amikor a sejtek életben maradása a cél. A természetes szelekció során több fehérjecsoport jelent meg, melyek funkciója a sejthalál programjának megakadályozása. A természetes apoptózisgátló fehérjék minden eddig megismert szinten képesek ellensúlyozni a sejthalál programját: gátlható a halálreceptorok ligand kötése, a sejthalált indukáló DISC kialakulása, a kaszpáz-8 hasadás, a mitokondrium membránban a csatornaképződés, valamint a kaszpázok aktiválódása is. Az antiapoptotikus fehérjék túlermelődése megnövekedett életidejű sejteket eredményezhet, melyeknek több ideje van rosszindulatú mutációk összegyűjtésére, ráadásul a hibás DNS-t tartalmazó sejt el sem pusztul.

A Fas-közvetített apoptózis gátlható:

- a. a Fas receptor és ligandja, a FasL összekapcsolódásának megakadályozása révén, melyet a *decoy családekreceptorok* szabályoznak, vagy a receptor szolubilizációja következtében. A DcR3-at (decoy receptor 3), mint FasL kötő faktort azonosították. Mivel a Fas kompetitora, anti-apoptotikus funkciói ismertek. Nagy mennyiségben termelődik a főtálas agyban, tüdőben, májban, a felnőtt lépben, tüdőben és vastagbélben. (A vastagbél- és tüdőrákos esetek 50%-a megnövekedett DcR3 expressziót mutat.) [13, 14]
- b. az aktív *DISC* kialakulásának blokkolásával, amit a FLIP (FLICE inhibitory protein) indukál. A FLIP szerkezetét tekintve a kaspáz-8 és -10 inaktív homológjának tekinthető, így a halálreceptorokról képes leszorítani a kaspáz-8-at. Néhány aminosavcsere miatt azonban nincs enzimaktivitása, ennél fogva gátolja, vagy módosítja a Fas közvetített apoptózist. Három variánsa fejeződik ki fehérje szinten: a 26 kDa rövid, a 24 kDa Raji sejtvonalban talált és az 55 kDa hosszú forma. Ez utóbbi cFLIP_L szerkezete csaknem azonos a kaspáz-8-cal. A cFLIP_L képes heterodimert is képezni a kaspáz-8-cal, így bár nincs enzimaktivitása, aktiválhatja partnerét, ami a kaspáz-8 részleges hasítását eredményezi (p43 kaspáz-8). A csak részlegesen hasított kaspáz-8 az apoptotikus utak beindítására azonban nem képes. Bár a cFLIP expressziója a sejten nagyon alacsony, aránya a DISC-ben viszonylag magas, mivel a kaspáz-8/cFLIP_L heterodimernek nagyobb az affinitása a FADD-hoz, mint a kaspáz-8 homodimernek. A cFLIP_L is hasítódik a heterodimerben ugyanúgy, ahogyan a kaspáz-8, így p43 cFLIP keletkezik. A p43 cFLIP is gátolja a sejthalált, ezen túlmenően azonban intenzívebben képes kapcsolatba lépni az NF-κB (nuclear factor –κB) aktiválásában szerepet játszó TRAF2-vel (TNF receptor associated factor) és a RIP1-gyel (receptor interacting protein). A részlegesen hasított kaspáz-8 szintén ismert, mint az NF-κB aktiválója. A cFLIP_L tehát egyrészt gátolja a Fas-közvetített apoptotikus szignálokat, másrészt az NF-κB aktiválásán keresztül a sejtek proliferációját is okozhatja [15, 16].
- c. a *mitokondrium* szintjén is, ahol a Bcl-2 család tagjai játszanak kulcsszerepet [17]. A család tagjainak elsődleges szerkezete eltérő lehet, de mindegyikükben megtalálható a négy konzervatív, ún. Bcl-2 homológ (BH) domén közül legalább egy. Az apoptózisgátló fehérjék (Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, Bcl-w, CED9, A1/BFL-1, Bcl-x_LΔTM) mind a négy BH domént tartalmazzák, míg a

proapoptikus molekulák (BAX, BAK, BAD, BIM, BID, BIK, PUMA, NOXA) nem. A dimerizációs képesség fontos jelentőséggel bír a Bcl-2 fehérjecsalád tagjai aktivitásának szabályozásában. A BAX, a BAK és a BOK fehérjék képesek a mitokondrium membrán áteresztőképességét közvetlenül megnövelni. Ezek a fehérjék az apoptózist serkentő hatásukat többnyire a citokróm c mitokondriumból való kiáramlásának szabályozása révén fejtik ki. A család anti-apoptotikus tagjai magakadályozzák ezen pórusképző fehérjék membránba épülését úgy, hogy heterodimereket alkotnak velük. A gátlók egy része képes más fehérjékkel is dimert képezni, elsősorban a proapoptotikus tagokkal. A csak BH3 domént tartalmazó proapoptotikus tagok egyrészt direkt módon elősegíthetik a pórusképző fehérjék működését, másrészt az antiapoptotikus tagokhoz kötődve gátolhatják azok asszociációját a porusformáló tagokkal, amelyek ezáltal felszabadulnak a gátlás alól. Összeségében a család anti- ill proapoptotikus tagjainak egymáshoz viszonyított arányán, egyensúlyán múlik, hogy az apoptózis gátlódik -e. A Bcl-2 fehérjecsalád legtöbb tagja a különböző sejtgorgellumok (mitokondrium, ER, sejtmag) membránjában található [17]. Néhány családtag (BID, BAX, BAD) a citoplazmában található, és csak megfelelő stimulus (sejthalál jel) hatására lokalizálódnak a mitokondrium membránjára [17]. A Bcl-xl képes az Apaf-1-hez kötődni, így gátolja az apoptozsoma kialakulását, a kaspáz-9 enzim aktiválódását [17].

- d. *apoptózis inhibitor fehérjékkel.* Az IAP (inhibitor of apoptosis protein) családba tartozó fehérjék (XIAP, c-IAP1, c-IAP2, livin és survivin) funkciója elsősorban a kaspázok (3,7,9) gátlásán keresztül az apoptózis megakadályozása. Minden IAP fehérje szerkezetében találunk legalább egy 70 aminosavat magába foglaló BIR (baculovirus IAP repeats) domént. A BIR domén kulcsszerepet játszik a kaspázok enzimaktivitásának gátlásában, közvetlenül kapcsolatba kerülve a kaspázokkal. A BIR motívum mellett több IAP családba tartozó fehérje tartalmaz egy RING (really interesting new gene) domént is, amely doménről ismert, hogy ubiquitinációt okoz, elősegítve az ubiquitinnel jelölt fehérjék proteozómális lebontását. Az IAP család tagjai tehát két módon is gátolják a kaspázokat, egyrészt az ubiquitin irányított fehérje degradáción, másrészt közvetlenül az enzimaktivitás gátlásán keresztül. Egyre több bizonyíték szól amellett is, hogy ezek a fehérjék a kaspázok gátlása mellett más szerepet is betölthetnek a sejtben. A c-IAP1 és c-IAP2 a sejtekben a TNF-receptorral egy

komplexben, a TRAF-1 és -2, illetve RIP molekulához kötődve is megtalálható. Szerepük bizonyított az NF- κ B transzkripciós faktor aktiválódásában. Az NF- κ B-ről ismert, hogy a sejtmagba jutva több, az apoptózis gátlásában fontos fehérje génjének átírását stimulálja, mint például a FLIP, a Bcl-2 és a Bcl-xl, valamint a c-IAP1, a c-IAP2 és a XIAP. Tehát az IAP-ek nem csak közvetlenül, hanem közvetetten is tudnak bizonyos kaszpázokat gátolni. A mitokondriális apoptózis útvonal intenzitását fokozza, hogy a SMAC/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases, direct IAP binding protein with Low pI) mitokondriális fehérje a citokróm c-vel egy időben ürül a mitokondriumból. A SMAC elsődleges szerepe a IAP-ek gátlása, ezáltal a sejteket érzékenyebbé teszi az apoptózisra [2, 18].

- e. *hő sokkfehérjékkel.* A sejtek számos stresszt okozó környezeti hatásra úgy reagálnak, hogy fokozottan expresszálják vagy aktiválják a hő sokkfehérjéket, amelyek segítik az alkalmazkodást és túlélést. A HSP27, HSP70 és HSP90 (heat shock protein) fehérjék bizonyítottan antiapoptotikus hatásúak. A HSP27 védelmet nyújt a magas hőmérséklet, az oxidatív stressz, a staurosporin, a FasL vagy a citotoxikus vegyületek sejthalál-indukáló hatásaival szemben. Elmondhatjuk, hogy ezen fehérjék az apoptotikus program minden pontját képesek gátolni. Szabályozott megjelenésük vagy mennyiségük csökkenése fontos mozzanata az apoptózis gátlásának vagy indításának. Túltermelődésük daganatok kialakulásához vezethet, virális homológjaik pedig megakadályozzák a gazdasejt vírusfertőzésre adott apoptotikus válaszát. Hiányuk számos megbetegedés alapját képezheti [19-21].

2.4. *Lpr, gld egerek tulajdonságai*

A Fas receptor és ligandja között létrejövő interakció alapvető szerepet játszik az immunológiai tolerancia fenntartásában. Megfelelő genetikai háttérű egértörzsekben a Fas receptor (lpr egér) illetve a FasL (gld egér) mutációja immundiszfunkciót okoz. A mutációk hatására hiperimmunoglobulinemia, glomerulonephritis, lymphadenopathia, splenomegalia alakul ki, valamint megnövekszik a B-sejtek és az autoreaktív B-sejtek száma [22]. Hasonlóan emberben, a Fas receptorban, illetve a Fas-függő jelátviteli kaszkád egyes szereplőiben előforduló mutációk felelősek az Autoimmun Limfoproliferatív Szindróma (ALPS) létrejöttéért [23-25].

Olyan lpr egerekben, amelyekben a Fas mutációja a T-sejtekre korlátozódik, a CD3+ B220+ CD4-CD8- T-sejtek populációjának abnormális akkumulálódását figyelték meg [26]. Azonban a T-sejt specifikus Fas deficiens egerekben nem detektáltak megnövekedett autoantitest termelést [26, 27]. B-sejt specifikus Fas deficiens egerekben splenomegalia alakul ki, valamint megfigyelhető az IgM-et és IgG2a-t termelő autoreaktív B-sejtek számának fokozódása, megnövekedett szérumszintű ellenanyag és autoantitest szint jelenik meg. Ugyanakkor a B220+ DN (double negative) T-sejt populáció nem alakul ki. A B-sejtekben történő Fas déléciónak előidézi az immunkomplexek lerakódását a vesében, a limfocita infiltrációt és szövetkárosodást a májban és a tüdőben, mely a 6-18 hónapos egerek halálához vezet [26, 27]. A B-sejtek antigénprezentáló kapacitásának növekedése miatt (fokozott MHCII expresszió és megnövekedett B-sejt szám) ezekben az egerekben a T-sejtek száma is emelkedett [26, 27].

Abban az esetben, ha a Fas deficiencia csak a dendritikus sejteket (DC) érinti, autoreaktív DNS elleni ellenanyag jelenik meg a szervezetben, az emelkedett autoantitest szint pedig hiperimmunoglobulinémiát, vaszkulitist és glomerulonefritist eredményez [26-29].

Ha lpr/lpr transzgén egérben visszaállítják a B-sejtek funkcionális Fas expresszióját, a B220+ B-sejtek expanziója miatt a lymphadenopatia még mindig megfigyelhető. A szérumszintű Ig szint azonban hasonló a vad típuséhoz, az anti-dsDNA elleni autoantitest szintje a szérumban pedig jóval alacsonyabb, mint a normál egérben [30]. Meglepetésre a csökkent autoantitest titer mellett az antigénspecifikus válasz is hiányzott a második immunizálást követően is [30]. Lpr egérben a specifikus B sejtek megnövekedett sejthalála a T-sejtek magasabb FasL expressziójával magyarázható, amely négyszer nagyobb lítikus aktivitást eredményez [31]. *In vitro* kísérletekben is kimutatták, hogy a fokozott Fas jelátvitel az antigén specifikus B-sejtek pusztulását eredményezheti [32].

Összességében B-sejteken a Fas funkciójának kiesése kontrollálatlan autoantitest termelést, autoimmunitást és B-sejtes limfómák kialakulása esélyének növekedését eredményezi, míg túlzott aktivitása gátolja a specifikus immunválaszt, így az *in vivo* vizsgálatok messzemenően igazolták a Fas fontos szerepét B-sejteken.

2.5. Fas a B-sejten

A B-limfociták fejlődésük során jelentős részben elpusztulnak, elsősorban apoptózissal. Azok a B-sejtek, amelyekben nem jutnak a sejtfelszínre funkcióképes antigén

receptorok, a pozitív szelekció során, azok pedig, amelyek receptora a V(D)J gének átrendeződése után autoreaktivitást mutat, azaz a saját antigéneket megkötik, a negatív szelekció során pusztulnak el. Az érett, perifériára kerülő limfociták közül a továbbiakban szintén negatív szelekcióval semmisülnek meg azok a klónok, amelyek a periférián előforduló saját antigéneket ismernek fel. Mindezek mellett, ha a limfocitákban irreverzibilis DNS-károsodás történik, vagy ha a túlélésükhöz szükséges faktorok eltűnnek mikrokörnyezetükből, ugyancsak sejtelhalás következik be.

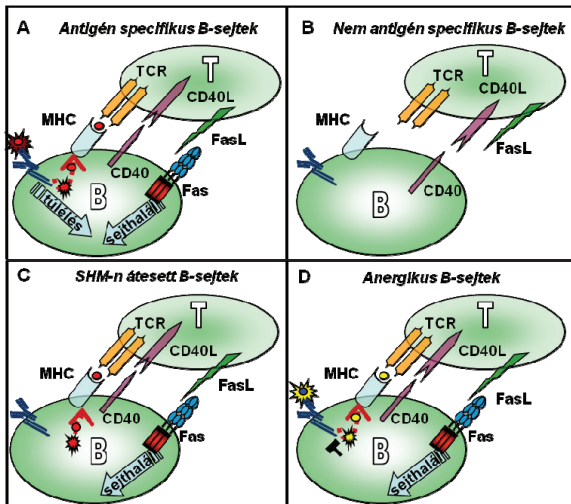
Irodalmi adatok alapján a csontvelői szelekciós folyamatokban a Fas receptornak nincs lényeges szerepe [33], viszont a periférián zajló B-sejt tolerancia kialakulásában kulcsfontosságú, de ennek pontos mechanizmusa még nem tisztázott. A naív (antigénnel még nem találkozott) B-sejtek a Fas-t nem, illetve kis mennyiségben expresszálják, de az antigén felismerése után - főként a T-dependens válsz során - a Fas-expresszió megemelkedik. Így az aktivált B-sejtek a FasL indukált apoptózis potenciális célpontjainak tekinthetők. A Fas legegységelműbb megjelenése és funkciója a germinális centrumban, az aktivált B-sejteken van [34-37], míg expressziója és feladata más B-sejteken erősen vitatott.

2.5.1. A Fas szerepe a germinális centrumban

Az antigént felismerő B-sejt a dendritikus sejt, mint antigénprezentáló sejt által aktivált antigén specifikus T-sejttel lép kapcsolatba (első ellenőrzőpont). Mivel az aktiválódott T-sejtek felszínén megjelenik a CD40L, a B-sejt T-sejt kapcsolat kialakulásakor a CD40 kostimulációs szignált szolgáltat a B-sejtek számára, mely hatására a B-sejteken megnövekszik a Fas expresszió [38-41]. Az így keletkezett B-sejtek az elsődleges csíráközpontokban elindítják a germinális centrumok (GC) kialakulását. Az érett szekunder follikulusban a B-sejtek proliferálódnak, miközben az Ig V-régió génjei szomatikus hipermutáción mennek keresztül. A szomatikus mutációt követően a germinális centrumokban megjelenő follikuláris dendritikus sejtek (FDC) által bemutatott antigénért folyó kompetíció során kiválogatódnak azon B-sejtek, melyek BCR-a nagy affinitással rendelkezik az adott antigén iránt. A folyamat során a FDC-ek egy pontosan nem ismert túlélő jelet is közvetítenek a B-sejtek számára (második ellenőrző pont). Ezt a szelekciós lépést követően az antigén specifikus B-sejtek a világos zónában újra T-sejtek ellenőrzése alá kerülnek (harmadik ellenőrző pont). A kis affinitással rendelkező, az antigénnel kapcsolatba nem kerülő B-sejtek eközben apoptózissal eliminálódnak a rendszerből. E lépés a B-sejtek Fas expresszióját igényli,

amit bizonyít, hogy lpr vagy gld egér esetén megnövekszik a szervezetben a B-sejtek száma és ezzel együtt a vérben az ellenanyagok szintje. Azon B-sejtek is elpusztulnak a kialakuló Fas-FasL kapcsolatnak köszönhetően, amelyek saját antigént ismernek fel. (Lpr és gld állatokban az autoantitestek megnövekedett szintjét is kimutatták.) FasL-ot elsősorban az aktivált, antigénspecifikus T-limfociták expresszálnak. Az életben maradt B-limfociták ezután memória- vagy plazmasejtté alakulnak [2].

A 2. ábra részletesen mutatja a T- és B-sejt közötti kapcsolatot a germinális centrumban.



2. ábra: A Fas szerepe a germinális centrumban

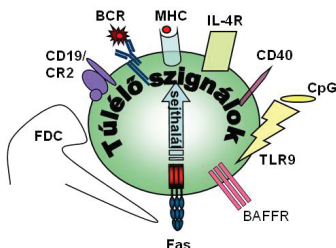
A B-sejtes immunválasz specificitását két tényező biztosítja; a BCR-antigén és a TCR-peptid-MHC (major histocompatibility complex) kapcsolat. Négy különböző kölcsönhatás fordulhat elő a GC világos zónájában a T- és B-sejt között:

- A. Amennyiben az antigén specifikus B-sejt prezentál a T-sejtnek, a két sejt között erős kapcsolat alakul ki, s a B-sejten kifejeződő Fas receptor megköti a T-sejten lévő FasL-ot. A Fas haláljelet közvetítene, azonban az antigén specifikus B-sejt életben marad köszönhetően annak, hogy a B-sejt receptor és a CD40 is túlélési jeleket közvetít a számára.
- B. A naív, nem antigén specifikus B-sejtek felszínükön nem expresszálnak Fas receptort, a T- és B-sejt között nem alakul ki kapcsolat.

- C. A szomatikus hipermutáció során kis affinitású BCR-rel rendelkező B-sejtek is képződhetnek. Ebben az esetben az antigénprezentáció megtörténhet, így kialakulhat a Fas-FasL kapcsolat, viszont a BCR-közvetített jel hiánya miatt a B-sejt nem kap túlélő jelet, így elpusztul.
- D. Anergikus B-sejtekben az autoantigén internalizációját követően megtörténik az autoantigén prezentációja, a B-sejt kapcsolódik a T-sejthez, de azt, hogy hogyan és miért pusztul el az anergikus autoreaktív B-sejt, még nem teljesen tisztázott. Az autoreaktív B-sejteket ebben az összefüggésben még nem vizsgálták részletesen. Az anergikus sejtekké vált autoimmun B-sejtek antigénkötő receptora a folyamatos aktiváció miatt deszenzitizálódik [42], így nem kapnak túlélő jelet a BCR-en keresztül. Feltételezhető, hogy az autoreaktív B-sejtet felismerheti a regulátor T-sejt, ami elpusztíthatja. További lehetőség, hogy valamilyen még nem azonosított sejthalált előidéző faktor szabályozza az autoreaktív B-sejtek elpusztítását.

2.5.2. A Fas-közvetített apoptózis ellen működő túlélő szignálok

A Fas-közvetített sejthalál gátolható antigén specifikus és nem antigén specifikus túlélő szignálokkal. Antigén specifikus túlélő jeleket közvetít a B-sejt receptor [34, 36, 43], az MHCII molekula [44] és a BCR-rel együttműködő koreceptorok [45, 46]. Nem antigén specifikus túlélést közvetít a CD40 receptor [47, 48], a sejt és sejt közötti kapcsolatban részt vevő adhéziós molekulák [49], a FDC [50], az IL-4 (interleukin-4) citokin [32, 51, 52], a hipometilált CpG (cytosine, phosphodiester, guanine) motívumot tartalmazó bakteriális DNS [53] és a BAFF (B-cell-activating factor) molekula [54]. (3. ábra)



3. ábra: Túlélő szignálok, melyek megmentik a B-sejtet a Fas-közvetített apoptózistól

BCR

Majdnem 20 éve ismert, hogy a FasL-ot hordozó antigén specifikus T-sejt elpusztítja a germinális centrum B-sejtet amennyiben az nem kap túlélő jelet. A legjobban ismert szignál, mely megmenti a B-sejtet a Fas-közvetített sejthaláltól, az az antigént felismerő B-sejt receptor.

Egér modellben a BCR-közvetített megmentés PKC-függő [32], szükséges hozzá fehérjeszintézis [32], valamint a Bcl-xl fehérje jelenléte és képződése [55]. Rothstein és munkacsoportja szerint a BCR-közvetített túlélés FAIM- (Fas Apoptosis Inhibitory Molecule) és Bcl-xl-függő folyamat [56], valamint később leírták, hogy NF- κ B-függő, mely transzkripció faktor elindítja a FLIP és Bcl-xl fehérjék génátíródását [57].

A20 egér B-sejtvonal esetében az anti-Fas ellenanyaggal kiváltott apoptózis gátolható anti-IgG-vel (anti-BCR), mely gátlás magával vonja a kaspázok aktivitásának csökkenését, a Bcl-xl fehérje mennyiségének növekedését, a PKC és a PARP proteolízis gátlását [55]. Ha az anti-Fas mellett anti-BCR-t adnak a sejteknek, akkor a DISC-ben kevesebb kaspáz-8 figyelhető meg [15], valamint anti-BCR hatására a c-FLIP_L expressziója megnő. A c-FLIP_L overexpresszió esetében a sejt rezisztens a Fas-közvetített apoptózisra. Egyes eredmények szerint A20 sejtvonalon a BCR-közvetített megmentéshez nem szükséges új fehérjék szintézise, viszont a kaspáz-8 és -3 aktivitása, valamint a Fas és a FADD egymáshoz való asszociációja is csökken [58]. A BCR szignálok kapcsán ismert, hogy a PKC inhibitor [59] és a PI3K inhibitor [60] gátolja az anti-BCR által közvetített megmentést.

CpG

A veleszületett immunrendszer az első védelmi vonal a patogénnel szemben, mely rendszer egyik legfontosabb tagja a mintázatfelismerő receptorok (PRR) együttese, ezen belül is a toll-like receptorok (TLR), melyek különböző struktúrájú patogén asszociált molekuláris mintázatot (PAMP) ismernek fel.

A TLR9 receptor által kerül felismerésre a CpG motívumot tartalmazó hipometilált bakteriális, virális vagy protozoa DNS-t mimikáló oligonukleotid (ODN). Ez a membránasszociált receptor a sejten belül endoszómák membránjában helyezkedik el. Egérben főleg a B-sejtek, a monociták és a dendritikus sejtek, emberben a pDC-ek és a nyugvó B-sejtek expresszálnak TLR9-et. A TLR9 receptornak a veleszületett és az adaptív immunválaszban is fontos szerep tulajdonítható.

CpG aktiváció hatására a plazmocitoid dendritikus sejt (pDC) IFN- α -t (interferon) és IFN- β -t termelnek, mely citokinek hatással vannak az NK- és T-sejtekre, valamint a konvencionális dendritikus sejtre (cDC). Ez utóbbi sejt aktiválódása a cDC érésehez vezet, mely eredményeként betöltheti antigénprezentáló és proinflammatorikus citokintermelő funkcióját. A cDC ezen kívül aktiválja az NK- és B-sejteket is. CpG hatására végül a nyugvó B-sejtek 95%-a aktiválódik. [61-64]

A TLR9 és BCR szinergisztikusan aktiválja a B-sejteket. A BCR felismeri a DNS-t az internalizációt követően a BCR-antigén komplexhez hozzákapcsolódik a TLR9 receptor, és kialakul egy autofagoszómaszerű kompartment [65]. A TLR9 közvetített jelpálya aktiválódásának következménye fokozott MAPK (mitogen-activated protein kinase) aktiváció és NF- κ B válasz [65]. Ezáltal a CpG elősegítheti az antigén specifikus B-sejtek aktivációját, de egyúttal csökkenti az aktivációs küszöböt, segítheti az autoantigén specifikus B-sejt választ is [65]. Mivel bizonyos körülmények között a saját DNS is aktiválhatja a TLR9 jelpályát, ez autoimmun betegségek kialakulásához vezethet [66]. A TLR9 közvetített jelek betegségek kialakulásában és a terápiában is nagy jelentőséggel bírnak. Az egyes típusú IFN-ok részt vesznek egyes autoimmun betegségek patogenezisében, így például a szisztémás lupus erythematosus (SLE) kialakulásában [67].

A CpG hatását a Fas-közvetített sejthalál folyamatokra egyetlen 1997-ben megjelent cikk tárgyalja. Eszerint primer egér sejtekben a CpG kezelés megvédi a CD40-en keresztül stimulált B-sejteket a CD4⁺ T-sejt indukált Fas-közvetített apoptózistól, miközben a B-sejt Fas expressziója lecsökken [53].

Amennyiben a TLR9 leucinban gazdag régiója (LRR) a receptor ligandjával, a CpG-vel asszociálódik, akkor a receptor trimerizálódik és a TIR citoplazmatikus doménen keresztül megindul a jelátvitel. A TLR9 asszociálódik a MyD88, az IRAK4 (interleukin-1 receptor associated kinase) és IRAK1 fehérjékkel. Az IRAK4 foszforilálja az IRAK1-et, mely következtében a TRAF6 fehérje is a komplex alkotójává válik. Ezután a foszforilált IRAK1 és TRAF6 disszociál a receptorról és új komplexet formál a TAK1-gyel (transforming growth factor- β -activated kinase-1), a TAB1-gyel (TGF- β -activated protein kinase 1-binding protein) és a TAB2-vel. Az IRAK1 degradálódik, a TRAF6 ubiquitinálódik, aminek következtében a TAK1 aktiválódik és beindul a MAPK kaskád és az NF- κ B út vonal. Ezzel párhuzamosan aktiválódik az IRF-7 (interferon regulatory factor-7) transzkripciós faktor, mely elindítja az egyes típusú IFN-ok termelését. Az IFN- α és IFN- γ citokinek BAFF expressziót indukálnak mieloid

sejteken [68-71] és B-sejteken [72, 73], ami többek között az immunoglobulin szekréciót fokozza [74].

BAFF

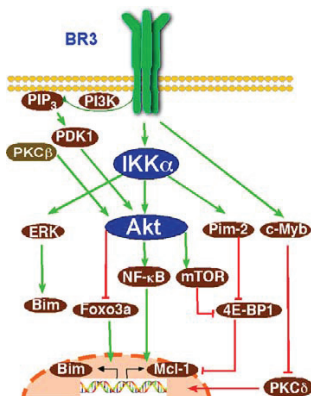
A TNF családba tartozó BAFF homeosztatikus citokin és receptorai fontos szerepet játszanak a veleszületett és adaptív immunválaszban, főleg az immunrendszer B-sejtjeinek szabályozásában [75]. A kilencvenes évek végén felfedezett BAFF legfontosabb szerepe a B-sejt túlélés elősegítése, de még mindig messze vagyunk a BAFF molekula pontos hatásainak, és azok jelátviteli útjainak tisztázásától [76].

A BAFF-hoz nagyon hasonlít az APRIL (a proliferation-inducing ligand), e két citokin három receptorral hozható kapcsolatba: TACI (transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor), BAFF-R (B-cell-activating factor receptor) és BCMA (B cell maturation antigen), mely receptorokat a különböző érési stádiumban lévő B-sejtek különböző mintázatban hordoznak, így funkciójuk is eltérő [77, 78]. A BAFF-R csak a BAFF-ot képes megkötni, a BCMA mindkettőt, de az APRIL-t jóval nagyobb affinitással, a TACI pedig hasonló affinitással képes kötni a BAFF-ot és az APRIL-t is [76]. Míg a BAFFR főleg a naív és a memória B-sejteken, a TACI a T2 állapot után a legtöbb B-sejttípuson jelenik meg [79], addig a BCMA elsősorban a plazmasejten expresszálódik [80, 81]. A BAFF membránkötött és szolubilis formában is aktív, [76] a Furin proteáz által legtöbbször lehasad a sejtfelszínről és szolubilis homotrimerként fejt ki hatását a BAFFR-hoz kötődve [76, 82, 83].

Ismert, hogy a BAFF közvetített jel fontos a B-sejtek homeosztázisában, túlélésében, szükséges a különböző érési stádiumban levő B-sejtek differenciálódásához, szelekciójának szabályozásához, plazmasejtté történő differenciációjához, szerepet játszik az antitestek izotípus váltásában [79], a memória B-sejt reaktiválásában, a regulátor B-sejtek fenntartásában [84], a T-sejt független II-es és a T-sejt függő IgM válaszban is [75]. A BAFF hiánya több mint 90% érett B-sejt elvesztését jelenti, míg overexpressziója megnövekedett B-sejt számot eredményez [76, 79, 80, 85]. BAFF overexpresszió esetében a B-sejtek aktivációs küszöbének csökkenése idővel autoimmun betegségek kialakulásához vezet, mint az SLE (systemic lupus erythematosus), az RA (rheumatoid arthritis) vagy a SS (Sjögren's syndrome) [77, 86-88]. Ennek megfelelően számos autoimmun betegségben kimutatták a BAFF, illetve az

APRIL megnövekedett szérumszintjét [79, 89-93]. Ezen autoimmun betegségek terápiájára BAFF, illetve APRIL inhibitorokat fejlesztenek ki, pl. Belimumab. **HIV**

A BAFF talán legfontosabb hatása az apoptózis gátlása B-sejtekben (4. ábra). A BAFF egyrészt az éretlen perifériás B-sejteknek közvetít túlélést, a tranzicionális 2-es B-sejteket megmenti a deléciótól, [76, 94, 95] másrészt konstitutív expressziója szükséges az érett B-sejtek hosszú távú túléléséhez is. A BAFFR aktiválása (4. ábra) elindítja az alternatív és a klasszikus NF- κ B útvonalat is [96-98]. Az alternatív út robosztusabb [96, 97, 99], de mindkét NF- κ B útvonalra szükség van a túlélés közvetítéséhez [96, 97, 99, 100]. BAFF-al történő stimuláció az alternatív útvonal aktivitásán keresztül csökkenti a Bim proapoptotikus fehérje mennyiségét [54, 101, 102], ugyanakkor az NF- κ B és a CREB (cAMP response element-binding) transzkripciós faktorokon keresztül fokozza az Mcl-1 (Bcl-2 család antiapoptotikus tagja) mennyiségét. [103]. Az alternatív út által szabályozott Akt/mTor (mammalian target of rapamycin) és Pim2 (phosphatidylinositol mannosides-2) útvonal alapvető a B-sejtek növekedésében és metabolizmusában [104].



4. ábra: Apoptózis gátlása a BAFF receptoron keresztül [80]

A BCR és BAFF szignálok együttműködését bizonyítja, hogy a BCR aktiválódása a Btk (Bruton's tyrosine kinase) – PKC (protein kinase C) - NF- κ B úton a BAFFR és a p100 fehérje átírását indukálja [105, 106]. A p100 a BAFFR-közvetített alternatív NF- κ B útvonal kezdeti eleme, így a BCR szignál nélkülözhetetlen a tartós, intenzív BAFFR

jelátvitelhez. A TLR-ok is fontos partnerei a BAFF útvonalnak, mivel NF- κ B aktiváción keresztül szintén növelik a BAFFR és p100 fehérje mennyiségét [80].

2.6. Fas a T-sejten

Azzal ellentétben, hogy a Fas-közvetített apoptózis nem játszik szerepet a B-sejtek csontvelői fejlődésében, a timocita Fas érzékeny, a tímuszban történő T-sejt szelekcióban szerepe van a Fas-nak [107]. Ezen túlmenően a perifériára került érett T-sejtek aktiváció indukált sejthalálát (AICD) eredetileg Fas-függő mechanizmusként írták le [108-110].

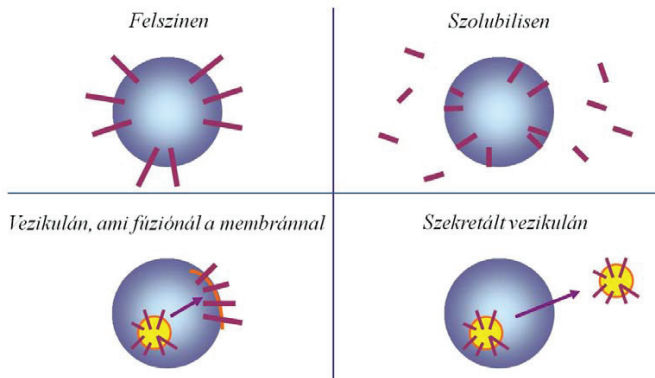
Amíg a naív T-sejt nem expresszál FasL-ot, addig az aktivált T-sejten megjelenik a FasL [111]. Emellett az aktiválódást követő 6. napon, ellentétben a 0. nappal, a T-sejt érzékennyé válik a Fas-közvetített apoptózisra. Aktivált T-sejteken a Fas receptor expressziója megnő, a FLIP antiapoptotikus fehérje mennyisége lecsökken [112], a Fas kolokalizál az ezrinnel [113]. Az ezrin hidat képez a plazmamembrán és az aktin alapú citoskeleton között, így részt vesz a sejtfelszíni struktúrák mozgásában, adhéziójában és összeszerveződésében, összekapcsolja a Fas-t a citoskeletonnal [113]. Az aktivált T-sejt a 6. napot követően a Fas és FasL fehérjék összekapcsolódása révén el tudja pusztítani saját magát (cisz pusztítás) és másik, ugyanabban az állapotban lévő társát is (transz pusztítás) [114].

A későbbiekben több *in vivo* kísérlet is alátámasztotta azt a hipotézist, hogy a klasszikus Fas-FADD-kaspáz-8 közvetített útvonal csak részben felelős az aktiváció indukált sejthalálért. Lpr [115-117] és gld [118] egerekben, valamint ALPS-es páciensekben [119] az AICD Fas-független módon is végbemehet. A TCR (T cell receptor) aktivációja a Fas-közvetített apoptózis mellett Fas-független, nem-apoptotikus sejthalál programot is stimulál, de ezt normál körülmények között elnyomja a Fas-függő apoptotózis [115]. Hasonlóan a Fas hibás működéséhez, a Fas-közvetített jelátvitel további szereplőinek hiánya sem vezet az AICD megszűnéséhez. Domináns negatív FADD-ot expresszáló T-sejtek nagyobb hányada pusztul el anti-CD3 + anti-CD28 aktivációra, mint a kontroll állatok T-sejtei [120]. FADD [121] vagy kaspáz-8 [122] deficiens egerek T-sejtei nagyobb intenzitással pusztulnak el plate-hez kötött anti-CD3 vagy anti-CD3 és anti-CD28 együttes hatására, mint a vad típusú állatokból származó T-sejtek. Továbbá ismert, hogy a FLIP anti-apoptotikus fehérje overexpressziója nincs hatással az AICD-re [123]. A FADD vagy kaspáz-8 deficiens állatokban tapasztalt intenzívebb sejthalál főleg egy nem-apoptotikus sejthalál útvonal aktiválásának

köszönhető, mely csökkenthető a RIP1 (receptor interacting protein 1) csendesítéssel [121, 122]. A legújabb irodalmi adatok szerint a FADD és a kaszpáz-8 hiánya megnövekedett RIP1/RIP3-indukált nekroptotikus sejthalált okoz, mely aktív kaszpáz-8 jelenlétében gátlódik [124-126]. További eredmények szerint a FADD képes gátolni a RIP-függő autofágiát, mely FADD hiányában szintén okozhatja a sejthalál intenzitás növekedését [124].

2.6.1. A FasL formái

Hasonlóan a TNF család többi tagjához, a FasL membránkötött és szolubilis formában is jelen van szervezetünkben (5. ábra). A FasL metalloproteázok által lehasadhat a sejtfelszínről [127], ezáltal trimerizált, de funkcionálisan inaktív szolubilis FasL képződik. A szolubilis FasL ezen formája kompetitíven gátolhatja a sejtfelszíni FasL által indukált sejthalált. A membránkötött FasL megjelenhet a sejt felszínén, vagy hematopoetikus sejtek esetében szekréciós granulumokba kompartmentalizálódhat [125, 126]. Megfelelő stimulus hatására ezek a vezikulák fuzionálnak a plazmamembránnal, és így a FasL időlegesen a metalloproteáz aktivitás ellenére is kifejeződik a sejtfelszínen [125, 128]. Az intracelluláris granulumokból, multivezikuláris testekből a FasL-ot hordozó membrán kompartmentek, mikrovezikulák kikerülhetnek az extracelluláris térbe, nagyrészt a target sejt felé irányítottan [129]. Amíg a nem aggregálódott szolubilis FasL nem aktív, szolubilis kompetítorként funkcionáló ligand [130, 131], addig az aktivált T-sejt felülűszójában biológiailag aktív, mikrovezikulához kötött FasL forma van jelen. Az AICD során ezáltal nem csak direkt sejt-sejt kapcsolaton keresztül váltható ki sejthalál, hanem a szekretált vezikulák által is. A FasL-ot tartalmazó szekretált vezikulumok által indukált sejthalál folyamatok csak részlegesen vizsgáltak, működésük kevésbé tisztázott.



5. ábra: A FasL megjelenési formái

2.6.2. A mikrovezikulák

A sejteken kívüli környezet nagy számban tartalmaz mobilis, membránnal körülvett extracelluláris vezikulákat. Ezen vezikulákat méretük szerint csoportosították. Exoszómáknak nevezzük a multivezikuláris testekből felszabaduló 50-100 nm-es partikulumokat, mikrovezikuláknak a nagyobb, 100-1000 nm átmérőjű membrán vezikulákat. Az apoptotikus testek az e fölötti mérettartományba esnek. A mikrovezikulák receptoron keresztüli aktiválás, apoptózis, vagy az intracelluláris kalcium szint növekedés hatására válnak le a sejtről. Alapvető funkciójuk például a prokoaguláns aktivitásuk, az IL-1 β szekréció, a Rheumathoid Arthritis patogeneziséhez és tumorok jellemzéséhez való hozzájárulás, az onkogén sejtranszformáció indukálása, valamint sejthalál indukálása is. A sokféle, így a vérben is előforduló mikrovezikulák nagyobb méretük és hozzáférhetőségük miatt széles körben használt diagnosztikai markerek. [132]

2.7. Nekroptózis

A sejthalál fajták két véglete az apoptózis és a nekrozis, melyek közötti átmeneti sejthalál formák megismerése egyre nagyobb szerepet kap, különösen a tumorterápia területén [133, 134]. Az egyik ilyen köztes sejthalál forma a programozott nekrozis, más néven nekroptózis.

A nekroptózis, mint RIP (receptor interacting protein) kináz függő programozott sejthalál vált ismertté. A RIP1 és RIP3 szerepe, kináz aktivitása kulcsfontosságú a

nekroptózis kialakulásában. (Bár már publikáltak RIP1 hiányában megjelenő nekroptotikus sejthalált is [135].) A nekroptózis a kaspázok aktivitását nem igényli, legtöbb formáját kaspáz gátlók jelenlétében írták le. A RIP1 és RIP3 fehérjék szerepe bizonyított a nekroptózisban, de ezen sejthalál forma pontos jelátvitelére még tisztázatlan. *In vivo* megjelenése ma még kevésbé ismert, bár szerepe egyes betegségek patogenezisében már bizonyított, így az isémiás sérülésekben, a neurodegenerációban és a vírusos fertőzésekben [136-138]. Bizonyos Toll-like receptorok (TLR3, TLR4) [139-141], az INF γ szignaling [142], az NF κ B út vonal gátlása [139, 143], valamint a sejthalál receptorok (Fas, TNFR1, TNFR2, TRAILR1, TRAILR2) [144-147] közvetítenek nekroptózist.

Manapság a nekroptózist talán leginkább az apoptózis tartalék folyamatának tekintik. Abban az esetben, ha az apoptotikus folyamatok gátoltak, előtérbe kerül a nekroptózis szerepe [145-147]. Kísérletes rendszerekben elsősorban kaspáz gátlók jelenlétében tanulmányozzák, míg *in vivo* megjelenése főleg egyes vírusok által előidézett kaspáz gátlás jelenlétében ismert [148].

2.7.1. A RIP1 szerepe

A RIP1 fehérje egy szerin-threonin kináz, mely kináz doménje, közbenső doménje és RHIM (RIP homotypic interaction motif) doménje mellett egy DD-t is tartalmaz, mellyel a sejthalál receptorokkal (Fas, TNFR1, TRAILR1, TRAILR2), valamint a TRADD (tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain) és a FADD molekulákkal lép interakcióba (6. ábra). Ismert, hogy a sejthalál receptorok agonistákkal történő stimulálása sejtípustól, mikrokoznyezettől, stimulátortól, aktivációs állapottól függően a sejt többféle, alternatív sorsához vezethet. Így indukálhatnak túlélést (az NF- κ B aktiválásán keresztül), valamint közvetíthetnek apoptózist, vagy éppen nekroptózist. A három esetben különböző molekulakomplexek szerelődnek össze, de mindegyik komplexben megtalálható a RIP1 molekula, így a RIP1 kináz az előbb említett folyamatok egyensúlyának szabályozásában kulcs szerepet játszhat.

Jelenlegi tudásunk szerint a RIP1 többféle poszttranszlációs módosuláson mehet keresztül:

- Egyrészt ismert a RIP1 dimerizációja. A RIP1 molekula, vagy csak a kináz doménjének indukált dimerizációja elegendő a nekroptózis elindításához [149]. A RHIM doménjén keresztül RHIM-RHIM interakció hatására összekapcsolódhat a RIP3-mal [148, 150], valamint a TLR3, illetve TLR4

receptorok adapterfehérjéjével, a TRIF-fel (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) [151]. Az így létrejött RIP1-RIP3 asszociáció nélkülözhetetlen a RIP1-közvetített nekroptikus folyamatokban [148, 152].

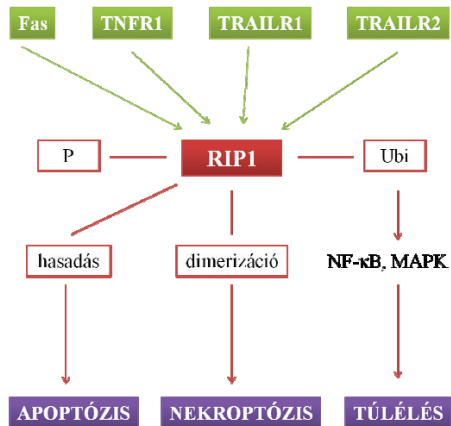
- Másrészt a RIP1 ubiquitinálódhat, mely folyamat szükséges a RIP1 NF- κ B aktivációjában betöltött szerepéhez [153]. A RIP1 ubiquitinációjában a TRAF2-nek és a IAP fehérjéknek tulajdonítanak szerepet [154, 155], míg deubiquitinációját az A20 és CYLD (cylindromatosis) enzimek végezhetik [156]. Ubiquitináció hiányában (IAP antagonisták jelenlétében, fokozott deubiquitináció hatására) a RIP1 nem képes NF- κ B aktivációra, ekkor apoptotikus vagy nekroptikus funkciói kerülnek előtérbe.
- A RIP1 foszforilálódhat is, melynek szerepe nem tisztázott. Ismert, hogy a RIP1 kináz aktivitása nélkülözhetetlen a nekroptózis kialakulásához [148], de a RIP1 foszforilációját a nekroptózis inhibitora, a nekrosztatin nem gátolja.
- Kaspáz aktivitás (főként a kaspáz-8) hatására a RIP1 hasítható is [157]. A hasítás következtében az NF- κ B aktiválás csökken, míg az apoptotikus aktivitás fokozódik.

Összeségében a RIP1 az NF- κ B aktiváció mellett (ubiquitináció) központi molekulája a sejthalál receptorok által indukált nekroptózisnak (RIP3 asszociáció) [144, 158].

RIP1 szerepe az apoptózisban:

A sejthalálreceptorok; a Fas-, a TRAIL-, illetve a TNF-közvetített apoptózis RIP1 deficiens sejtekben egyaránt normális vagy fokozott, azaz a RIP1 nem vesz részt ezen apoptotikus folyamatokban [159, 160]. IAP antagonisták jelenlétében - csökkent RIP ubiquitináció esetén - azonban részt vesz a sejthalálreceptorok által indukált apoptotikus folyamatokban. IAP antagonisták a Ripoptoszóma molekulakomplex képződését indukálják. A Ripoptoszóma tartalmazza a RIP1, a FADD és a kaspáz-8 molekulákat és a kaspáz-8 aktivációját indukálja [138, 141]. Ez a sejthalál forma apoptotikus jellegzetességeket mutat szemben a nekroptózissal. A DNS fragmentálódik, a sejtmag kondenzálódik, kaspáz-8 és kaspáz-3 aktivitás kimutatható. Ennek megfelelően a RIP1-függő apoptózis kaspáz inhibitorokkal gátolható. (A nekroptózis kaspáz inhibitorok jelenlétében fokozódik.) [161] A IAP antagonisták tehát fokozzák mind a RIP1-függő nekroptózist, mind a RIP1-függő apoptózist.

Mostanában felszínre került érdekes megállapítás, hogy a FasL-ot hordozó szekretált vezikula okozta sejtpusztulás RIP1-függő folyamat [162, 163].

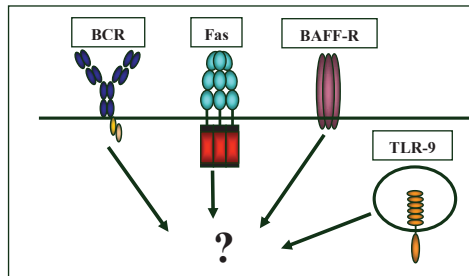


6. ábra: RIP1 szerepe

3. Célkitűzések

A germinális centrumban az antigént nem vagy kis affinitással felismerő, illetve autoreaktív B-sejt klónok Fas-közvetített apoptózissal elpusztulnak, ha nem kapnak túlélő jelet a B-sejt receptoron vagy az antigén specifikus T-sejtek révén a CD40-en keresztül. Célul tűztük ki más, még nem vizsgált túlélő jelek hatásának vizsgálatát, valamint egy nem sejt-sejt kapcsolaton alapuló sejthalál forma jellemzését.

1. Célunk volt a BCR, valamint a tumor nekrosis faktor családba tartozó B-sejt aktiváló faktor (BAFF), a bakteriális DNS-t felismerő TLR-9 és az aktivált B-sejteken megjelelő Fas sejthalál receptor által stimulált jelpályák közötti kölcsönhatások vizsgálata és a kölcsönhatások megvalósításában résztvevő jelátviteli molekulák azonosítása.



2. További vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy (enzimatikusan, morfológiailag, immunológiailag, illetve funkcionálisan) milyen tulajdonságokat mutat a FasL-ot hordozó szekretált vezikulát (Vsec) tartalmazó felülúszó által közvetített sejthalál forma, hogy mely sejtek termelhetik a killer felülúszót. Célul tűztük ki ezen szekretált vezikula közvetített sejthalál összehasonlítását más, az irodalomban használatos Fas agonistákkal indukált sejthalálokkal.
3. Célunk volt annak a kérdésnek a tisztázása, hogy a Vsec által indukált sejthalál gátlható -e az első pontban említett túlélő faktorokkal.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált oldatok

RPMI 1640 sejtenyésztesztő médium

PRMI 1640	15,36 g/l
NaHCO ₃	2 g/l
Na-piruvát	110 mg/l
Glutamin	292 mg/l
Sztreptomicin	50 mg/l
Penicillin	100000 NE/l

PBS-puffer

NaCl	8 g/l
KCl	0,2 g/l
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,424 g/l
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	2,866 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l

Mintapuffer (2×-es)

0,5 M Trisz/HCl (pH 6,8)	1 ml
10% SDS (szodium dodecil szulfát)	1,6 ml
Glicerol	800 µl
Brómfenolkék	200 µl

10×-es Tris-glicin elektród puffer (1l)

Tris	0,25 M
Glicin	1,92 M

Elektroforézis futtató puffer

10×-es Tris-glicin-puffer	100 ml
10%-os SDS (szodium dodecil szulfát)	10 ml
MilliQ víz	890 ml

Blottoló puffer

10×-es Tris-glicin-puffer	100 ml
MilliQ víz	900 ml

Szeparáló gél (10%-os, 10ml)

30% akrilamid/bisz-akrilamid	3,33 ml
MilliQ víz	4,02 ml
1,5 M Trisz/HCl (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS (szodium dodecil szulfát)	100 µl
10% APS (ammónium-persulfát)	50 µl
TEMED	5 µl

Fésűgél (mintagél, 4%-os, 10ml)

30% akrilamid/bisz-akrilamid	1,32 ml
MilliQ víz	6,03 ml
0,5 M Trisz/HCl (pH 6,8)	2,5 ml
10%SDS	100 µl
10% APS (ammónium-persulfát)	50 µl
TEMED	10 µl

10×-es TWB-puffer

Trisz	24,22 g/l
NaCl	80 g/l
MilliQ víz	1 l

TWB-Tween puffer

10×-es TWB-puffer	100 ml
Tween-20	50 µl
MilliQ víz	900 ml

2 m/v %-os tej

sovány tejpor	1 g
TWB-Tween	50 ml-re

FACS-puffer

PBS

1% BSA

0,1% NaN₃

Hank's puffer (pH 7,4)

NaCl 143 mM

Na₂SO₄ 1 mM

KCl 5 mM

Na₂HPO₄ 1 mM

MgCl₂ 0,5 mM

CaCl₂ 1 mM

glükóz 5 mM

Hepes 10 mM

PI (propidium jodid)

38 mM-os Na-citrát 50 ml

RNáz 25 µl

PI 250 µl

1000×-es PI (10 µg/ml)

PBS 50 ml

PI 50 µl

4.2. Használt ellenanyagok, specifikus reagensek

4.2.1. Sejtfelszíni és intracelluláris fehérjék kimutatásához

<i>Elnevezés</i>	<i>Gyártó, származás</i>
<i>Áramlási citométerhez</i>	
α humán BAFFR	R&D
CY5 konj α kecske IgG	Jackson ImmunoResearch
α humán DX2-FITC	Abcam
α humán DX2-PE	Miltenyi biotech
α egér DX2-FITC	Becton Dickinson
α egér IgM-FITC	Serotec
α IgM-biotin	Jackson ImmunoResearch
sztreptavidin-FITC	Sigma

<i>Elnevezés</i>	<i>Gyártó, származás</i>
<i>Western blothoz</i>	
α humán FADD	MBL
α humán kaszpáz-8	MBL
α humán kaszpáz-9	MBL
α humán RIP1	BD Bioscience
CD20 humán anti-Fas	Santa Cruz
α egér HRPO	Jackson ImmunoResearch
α nyúl HRPO	Jackson ImmunoResearch
ECL	Pierce

4.2.2. Sejthalál indukálásához

<i>Elnevezés</i>	<i>Gyártó, származás</i>
CH11 anti-Fas ella.	Upstate
JO2 egér anti-Fas ella.	Becton Dickinson
rekombináns FasL	Alexis Corporation
M2 anti-FLAG ella.	Sigma-Aldrich

4.2.3. Túlélő faktorok, aktivátorok, citokinek

<i>Elnevezés</i>	<i>Gyártó, származás</i>
α humán rekombináns BAFF	R&D
α egér rekombináns BAFF	R&D
BU1 α humán IgM	ajándék Dr. Jefferis-től
α egér IgG	Sigma-Aldrich
CpG ODN	Invivogen
PHA	Sigma-Aldrich
Poli (I:C)	Invivogen
LPS	Invivogen
r LPS	Alexis
s LPS	Alexis
CL075	Invivogen
IL-2	Peptrotech
IL-4	Peptrotech
GM-CSF	Gentaur
citokinkoktél	Peptrotech

4.2.4. Gátlók

<i>Elnevezés</i>	<i>Gyártó, származás</i>
CHX	Sigma-Aldrich
PI3K gátló	Sigma-Aldrich
PKC gátló	Vicchem
p38 gátló	Calbiochem
TAK1 gátló	Calbiochem
zVAD pan kaspáz gátló	Alexis Corporation
Katepszin D gátló (pepszatin)	Calbiochem
TNFR1:Fc	AG, Scientific, ING.

4.2.5. Egyéb reagensek

<i>Elnevezés</i>	<i>Gyártó, származás</i>
CellTracker Green	Invitrogen
D2-R110 kaspáz szubsztrát	Invitrogen
Phiphilux kaspáz3 szusztrát	Interchim
PI	Sigma-Aldrich
RNáz	Sigma-Aldrich

4.3. Sejtenyésztés

Kísérleteinkben használt sejteket, sejtvonalakat 10% FCS-t (Foetal Calf Serum) tartalmazó RPMI 1640 komplett médiumban tartottuk (egérsejt esetében 50 μ M merkaptotienollal kiegészítve) 37°C-on és 5% CO₂-on.

Egér B-sejtvonalként A20 limfoblasztoid sejtet használtunk.

A következő humán B-sejtvonalakat tenyésztettük: HT58, Daudi, WSU, BL41, Ramos, BJAB, SKW6.4, valamint vad típusú és FasL-dal overexpresszált WSU.

Humán T-sejtvonalak, melyeket vizsgálataink során használtunk: vad típusú és RIP-/- SVT35 Jurkat; FasL-dal overexpresszált, Fas-/-, Fas-sal újratranszfectált Jurkat Rapo; JA3 Jurkat és FADD, kaspáz-8, kaspáz-9 negatív szubklónjai.

Az eddig felsorolt sejtvonalakon kívül Ficoll-lal történő centrifugálással (2000 rpm, 20 perc) izoláltunk friss mandulából limfocitákat és vérből humán PBMC-t. A T-sejt blasztot (6 napos PBMC-t) 1 napig 2 μ g/ml PHA-val, 6 napig 2ng/ml IL-2-vel stimuláltuk, miközben 48 óránként cseréltük a médiumot.

DC szeparálás: A PBMC-ből CD14-gyel fedett mikrogyöngy segítségével mágneses szeparálással elválasztottuk a monocitákat, majd az 5 napon kersztül IL-4-et (500 U) és GM-CSF-t (800 U) adtunk, melyeket a 2. és 5. napon az etetésekkel pótolunk. Így

différenciáltattuk az éretlen dendritikus sejteket. Érett DC-ek előállítására az 5. napon 24 órán keresztül LPS-sel (100 ng/ml) aktiváltuk a differenciáltott iDC-et.

4.4. Immunfluoreszcens jelölés FACS analízishez

4.4.1. Sejtfelszíni fehérje expresszió mérés

A különböző specificitású ellenanyagokkal történő jelölés minden esetben a következő módon történt: 10^6 db sejtellethez hozzáadtuk az elsődleges, vagy a direkt jelölt ellenanyagot, majd 20 percig, 4°C-on, sötétben inkubáltuk, és utána FACS pufferrel mostuk (5 perc, 1500 rpm). Kettős (indirekt) jelölés esetén a mosás után a sejthez hozzáadtuk a második ellenanyagot, amivel szintén 20 percig, 4°C-on, sötétben inkubáltuk, majd újra mostuk. Végül a mintákhoz 300 µl FACS-puffert adtunk és a sejtfelszíni fehérjeexpressziót FACS Calibur áramlásos citofluoriméterrel (Becton Dickinson) mértük. Minden mintából 10000 db sejtet mértünk le. Az eredményeket Cellquest vagy FCS Express program segítségével értékeltük ki.

4.4.2. Intracelluláris fehérje expresszió mérés

Az egyes jelölési lépések intracelluláris jelölés esetében hasonlóan az előbb leírtakhoz sötétben, 4 °C-on és 20 percig történtek. Ám itt a jelölést fixálás és permeabilizálás előzte meg. A fixáláshoz 10^6 db sejtellethez 500 µl 2%-os paraformaldehidet adtunk, amit 10 perc után, fugálást (5 perc, 1500 rpm) követően eltávolítottunk. Ezután a mintákhoz 1 ml 0,3%-os szaponin permeabilizáló oldatot mértünk, 5 percig vártunk, majd a sejteket lefugáltuk, s ezt még egyszer megismételtük. A jelölést és innentől fogva a mosásokat is ezzel a szaponinos oldattal végeztük. Végezetül a mintákhoz 300 µl FACS-puffert adtunk és a sejtfelszíni fehérjeexpressziót FACSCalibur áramlásos citofluoriméterrel (Becton Dickinson) mértük. Minden mintából 10000 sejtet mértünk le. Az eredményeket Cellquest vagy FCS Express program segítségével értékeltük ki.

4.4.3. SDS-Page és Western Blot

3×10^6 db kezeletlen sejtet végeztük a kísérletet. A sejtelleket összekevertük 2×-es 100ul Laemmli pufferrel és 5 percig forraltuk 95°C-on, majd rövid ideig szonikáltuk, végül újra felforraltuk.

Az így elkészült mintákat gélelektroforézisnek vetettük alá, melyet 10%-os SDS-poliakrilamid gélben 120-140 V feszültség mellett végeztünk. Ezt követően a méretük alapján szétválasztott fehérjéket nintrocellulóz membránra blottoltuk 200 mA-en, 90 percig. A különböző ellenanyagokkal történő immunoblotot a cég által leírt protokollal végeztük.

szerint végeztük, az ellenanyaggal fedett fehérjéket ECL reagens segítségével hívtuk elő. A membránt 2%-os, 0,05% Tween20-at tartalmazó TWB pufferben oldott zsírszegény tejporral blokkoltuk 30 percig, majd TWB-0,05% Tween20 pufferben, a javasolt hígításnak megfelelően az elsődleges ellenanyaggal 1 órát szobahőmérsékleten inkubáltuk. Háromszori mosás (10 perc, TWB-0,05% Tween20) után a membránt HRPO-val jelölt, fajspecifikus másodlagos ellenanyaggal fedtük (1 óra), melyet a tejes oldatban hígítottunk. Végül a membránt 1 órán keresztül mostuk (6x10 perc, TWB-0,05% Tween20).

4.5. Sejthalál indukálása

A sejtszámot minden esetben 10^6 db/ml-re állítottuk be, melyből 400 μ l-t pipettáztunk a FACS-csővekbe. Ha volt, az előkezeléseket elvégeztük, majd a sejthalált indukáló faktort a kívánt koncentrációban, a szükséges időre 100 μ l-rel hozzáadtuk a sejtekhez.

A sejthalált kiváltottuk:

- FasL-dal, melyet keresztkötöttünk FLAG ellenes ellenanyaggal, 1 μ g/ml M2-vel. 24 órán keresztül inkubáltuk a sejteket különböző koncentrációban, 20 (humán T-sejtvonalak), 40 (humán B-sejtvonalak) és 100 ng/ml-es (PBMC, mandula sejtek) FasL-dal.
- különböző koncentrációjú CH11-gyel, human anti-Fas ellenanyaggal, mellyel 24 órán keresztül inkubáltuk a sejteket.
- A20 egér sejtekben 2 órai 100 ng/ml JO2-vel (anti-Fas ellenanyag) történő kezeléssel.
- co-culture-rel, ekkor FasL-dal overexpresszált WSU B-sejtet reszuszpendáltunk CellTracker Green festékkel (5 μ M), majd 30 percre 37°C-os vízfürdőbe helyeztük. Ezután lecentrifugáltuk (10 perc, 1200 rpm), és friss médiummal 30 percre sejtenyészítő termosztátba helyeztük, majd háromszor mostuk, végül a kívánt arányban a célsejthez adtuk. A két fajta sejtet 1 napig együtt inkubáltuk, majd a megfelelő kezeléseket követően a CellTracker negatív populációt áramlásos citométerrel vizsgáltuk.
- felülúszóval (Vsec-mal). 4 millió/ml koncentrációjú FasL-dal overexpresszált Jurkat Rapo T-sejtvonalat, frissen izolált mandula sejtet vagy PBMC-t 100 μ g/ml PHA-val 5 percen keresztül, a dendritikus sejteket a jelzett aktivátorral 15 percig stimuláltunk, majd a sejteket háromszor mostuk és végül friss médiumban

vettük fel. 2 óra termosztátban történő inkubálás után összegyűjtöttük a felülúszót és a célsejtekhez adtuk, 24 óra elteltével mértük a sejthalált.

B-sejtek előkezelése túlélést segítő reagensekkel

A legtöbb esetben a sejthalál indukálása előtt a sejteket előkezeltük különböző túlélést támogató faktorokkal. A 400 µl sejtszuspenzióhoz kis térfogatban adtuk a különböző fehérjéket, DNS-t.

Az SKW6.4 sejtekhez 1 órával a FasL-ot megelőzve adtuk az anti-IgM-et (10µg/ml), és 1 vagy 24 órával megelőzve a humán rekombináns BAFF-ot (30 ng/ml).

A20 egér B-sejtek esetében az anti-Fas ellenanyag, illetve a citotoxikus felülúszó előtt egy órával kezeltük a sejteket 0,15 µg/ml BAFF-al, 0,3 µM CpG ODN-nel, illetve 0,074 µg/ml anti-IgG-vel vagy ezek kombinációival. A koncentrációfüggéses kísérleteinkben több koncentrációban használtuk a túlélő faktorokat.

B-sejtek előkezelése gátlószerekkel

Annak megállapítására, hogy a Fas-közvetített apoptózistól való megmentés és a felülúszóval kiváltott sejthalál milyen jelpályán keresztül valósul meg, kísérleteinkben különböző inhibitorokat alkalmaztunk.

Az SKW6.4 humán B-sejteket a túlélő faktorok hozzáadása előtt 1 órával 0,03µg/ml cikloheximiddel (CHX) kezeltük.

A PI3K (10µM), a PKC (1µM), a p38 (20µM) és a TAK1 (10µM) inhibitorokkal történő 30 perces előkezelés után adtuk az A20 sejthez a túlélő faktorokat

A citotoxikus felülúszó előtt 30 perccel adtuk a katepszin D-t (50 µM) vagy a Z-Vad-ot (10 µM) a célsejtekhez. A TNFR1:Fc-vel (200 ng/ml) 30 percig kezeltük a felülúszót, mielőtt azt a sejtekhez adtuk volna.

Szekretált vezikula szeparálása (ultracentrifuga)

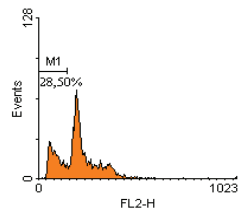
Az aktivált sejtek felülúszóját ultracentrifugálásnak vetettük alá. A 2 órás inkubációt követően a sejteket 15000 rpm-en 10 percen keresztül centrifugáltuk, majd az így nyert felülúszót 70000 g-re, 2 órára ultracentrifugába helyeztük. Az így kapott felülúszóval és 0,5 ml médiumban reszuszpéndált pellettel stimuláltuk a célsejteket, indukáltunk sejthalált.

4.6. A citotoxicitás mérése

Az aktivált sejtek által termelt felülűszó, a rekombináns FasL-M2, a CH11, a JO2 anti-Fas ellenanyag, valamint a FasL-ot expresszáló WSU sejtek sejtpusztító képességét a subG1 csúcs és a membránintegritás meghatározásával mértük áramlások citométer segítségével.

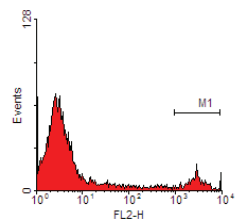
4.6.1. Apoptózis mérése (subG1)

Adott időtartam után a termosztátból kivett sejteket lefixáltuk, azaz a sejtellethez vortexelés közben 1 ml hideg 70%-os etilalkoholt csöpögtettünk, s 1 órára jégbe helyeztük. Ezek után a sejteket centrifugálást követően 1 ml 38 mM-os Na-citrátot oldattal (pH 7.4) mostuk, végül 300 µl PI oldatot mértünk a csövekbe. 20 perc eltelte után FACS Calibur áramlások citométerrel mértük az apoptózist, a subG1 csúcs arányát.



4.6.2. Membránintegritás mérése (PI)

Az elpusztult sejtek mennyiségét, arányát kvantifikáltuk a membránintegritás elvesztésének vizsgálásával is. A kísérlet végén a sejtellethez 300 µl 1000x-es PI oldatot adtunk, majd áramlások citométerrel mértük, hogy a sejtek hány százaléka vette fel a propidium jodidot, azaz mennyi sejt vesztette el membránintegritását.



4.7. Konfokális mikroszkópia

A sejthalál morfológiáját Olympus IX81 konfokális mikroszkóp Fluoview 5-SU lézerpásztorozó egységével és Olympus 1,25 numerikus apertúrájú olajimmersion 60x-os objektívvel (Olympus-Europe, Hamburg, Germany) vizsgáltunk. A mintákat 10 µg/ml-es PI-os oldattal festettük meg.

4.8. Kaspázaktivitás mérés

4.8.1. Általános kaspázaktivitás mérés

Az A20 sejteket másfél óráig inkubáltuk 100 ng/ml anti-Fas ellenanyaggal, majd a sejtellethez 50 µl 50 µM-os kaspázszubsztrátot (D2-R110) adtunk Hank's pufferben.

30 perces inkubálást és Hank's pufferrel történő mosást követően a kaszpázaktivitást, azaz az aktív kaszpázok által hasított fluorescens R110 szubsztrát mennyiségét áramlási citométerrel mértük (FACS Calibur, BD).

4.8.2. Kaszpáz-3 aktivitásának mérése

Sejtpermeábilis fluorogén szubsztrátot (Phiphilux) használtunk intakt sejtek kaszpáz-3 aktivitásának monitorozására a gyártó utasításai szerint. 0,5 ml $0,5 \times 10^6$ db/ml koncentrációjú sejtet aktiváltunk 12 órán keresztül, majd a sejtellehez 40 μ l kaszpáz-3 szubsztrátot adtunk, s a reakciót áramlási citométerrel vizsgáltuk.

5. Eredmények

5.1. A túlélést segítő és a Fas-közvetített sejthalált kiváltó jelek interakciójának vizsgálata B-sejteken

Vizsgálataink célpontjában autoimmun folyamatok és tumoros megbetegedések kialakulásában, illetve lefolyásában részt vevő molekulák álltak. Kísérleteink első felében túlélést, illetve sejthalált indukáló faktorok által stimulált jelpályák kölcsönhatását vizsgáltuk. Kíváncsiak voltunk, hogy a Fas sejthalál receptor, a B-sejt receptor (BCR), a B-sejt aktiváló faktor receptor (BAFFR), valamint a toll-like receptor 9 (TLR-9) által közvetített jelek milyen hatással vannak egymásra, hogyan és milyen molekulákon keresztül befolyásolják e receptorok egymás, az immunrendszerben betöltött szerepét.

5.1.1. Vizsgálatok humán SKW6.4 B-sejtvonalon

5.1.1.1. Alkalmas B-sejtvonal kiválasztása

A rendelkezésünkre álló humán B-sejtvonalak közül olyan sejtvonalat választottuk, amely sejtfelszínén egyaránt expresszál BAFF receptort, Fas-t és sejtfelszíni IgM-et; ami anti-Fas ellenanyag hatására elpusztul, valamint amelyik anti-IgM előkezelés hatására megmenekül a Fas-közvetített apoptózistól. Ezen előkísérleteink alapján, mely eredményét az 1. táblázat reprezentálja, további vizsgálatainkhoz az SKW6.4 limfoblasztoid humán B-sejtvonalat találtuk alkalmasnak.

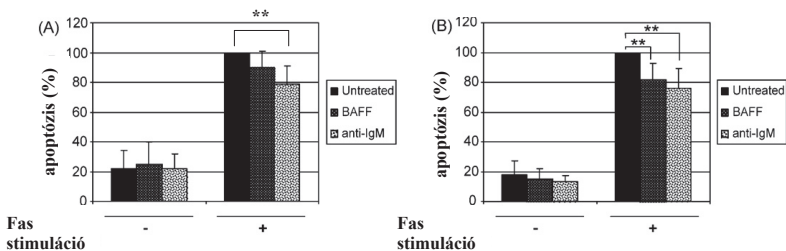
Sejtvonalak	BJAB	BL41	Daudi	HT58	Ramos	SKW6.4	WSU
BAFFR	+	+	+	-	+	+	+
Fas	+	-	-	-	-	+	-
Fas-közvetített apoptózis	+	-	-	-	-	+	-
IgM	+	+	+	+	+	+	+
IgM-közvetített túlélés	-	-	-	-	-	+	-

1. táblázat: Az SKW6.4 B-sejtvonal expresszál sejtfelszíni BAFFR-t, Fas-t és IgM-et, valamint FasL hatására elpusztul, mely sejthalál mértéke anti-IgM előkezelés hatására csökken

A + jel azt jelenti, hogy az adott sejten az adott receptor megtalálható, vagy a folyamat lejártszódik; a – jel azt mutatja, hogy a sejt a receptort nem expresszálja vagy a folyamat nem figyelhető meg.

5.1.1.2. A BAFFR által közvetített szignál hatása a Fas-közvetített apoptózisra

Ismert, hogy az anti-BCR, valamint a CD40L megmentik a B-sejtet a Fas-közvetített apoptózistól [34, 43, 47]. A BAFF ligandumot (BAFFL), mint a B-sejtek túlélését indukáló molekulát tartják számon az irodalomban, de pontos funkciója, az általa okozott jelátvitel még nem teljesen tisztázott. Vizsgálataink elején arra voltunk kíváncsiak, hogy a B-sejtek érésében, differenciációjában fontos BAFF „fitness faktor” befolyásolja-e a Fas-közvetített apoptózist. SKW6.4 sejteket 1 óráig, illetve 24 óráig előkezeltük BAFFL-dal. Az előkezelést követően a sejteket FasL-dal stimuláltuk, majd 24 órás inkubációt követően mértük a sejtek apoptózisát. Abban az esetben, ha a BAFFL-t csak 1 órával adtuk a FasL kezelés előtt a sejtekhez, nem tapasztaltunk szignifikáns megmentést (7.A ábra). Ezzel szemben az 1 órás anti-IgM előkezelés szignifikánsan csökkenti a Fas-közvetített sejthalált (7.A ábra). Az ismert túlélő jelek kapcsán - anti-IgM, anti-CD40 - több esetben leírták, hogy a túlélő szignálok antiapoptotikus fehérjék szintézisén keresztül fejtik ki hatásukat [164]. Feltételeztük, hogy a BAFFL hatása is anti-apoptotikus fehérjék megjelenését követően érvényesülhet, így csak jóval a sejthalált indukáló jelek előtt adva funkcionál. Ennek a kérdésnek a vizsgálatához elvégeztük a kísérleteket hosszabb, 1 napos BAFFL-dal történő inkubálási időt alkalmazva. Ahogy a 7.B ábrán látható, amennyiben a BAFFL-t 1 nappal a FasL előtt adtuk az SKW6.4 sejtekhez, kismértékű, de jól reprodukálható, szignifikáns túlélést, Fas-közvetített apoptózis gátlást detektáltunk.



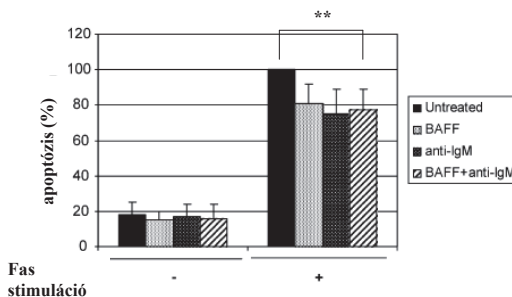
7. ábra: A BAFFR szignál megmenti az SKW6.4 B-sejtet a Fas-közvetített apoptózistól

10^6 db/ml koncentrációjú SKW6.4 sejtet inkubáltunk 1 órán (A) vagy 24 órán (B) keresztül 30 ng/ml rekombináns humán BAFFL-dal, illetve 1 órán keresztül 10 μ g/ml anti-IgM-mel. Az előkezelést követően 40 ng/ml rekombináns humán FasL-dal kezeltük a sejteket. A FasL keresztökötését anti-FLAG ellenanyaggal (1 μ g/m M2) végeztük. A FasL kezelést követően 24 óra múlva határoztuk meg az apoptotizáló sejtek százalékát, a subG1 fázis citofluoriméterrel történő mérésével. Az ábrán a csak FasL által okozott sejthalál százalékában (100%) ábrázoljuk a túlélőjelek intenzitását.

**** $p < 0,01$**

5.1.1.3. A BAFF hatása az anti-BCR által kiváltott túlélő szignálra

Mind az anti-BCR, mind a BAFFL stimulus csökkenti a B-sejtek FasL indukált apoptózist. Arra kerestük a választ, hogy szimultán anti-IgM és BAFFL kezelés milyen hatással van a Fas-közvetített apoptózisra, vagyis a BAFF szigál befolyásolja –e az IgM-közvetített túlélést (8. ábra). Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a két túlélő szignál hatása nem additív, a BAFF szignál nem változtatja meg a BCR-közvetített túlélést, az anti-IgM és a BAFFL nem erősítik egymás hatását, nincs szinergizmus a BAFFR és B-sejt receptor által közvetített túlélő szignálok között humán SKW6.4 B-sejtvonal esetében.



8. ábra: A BAFFL nem módosítja az anti-BCR által kiváltott túlélő szignált SKW6.4 humán B-sejtvonalon

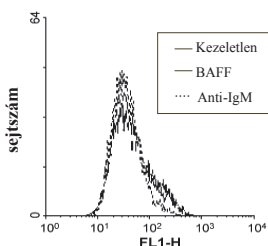
Az anti-IgM-t (10 μ g/ml) 1 órával, a BAFFL-t (30ng/ml) 24 órával a 40 ng/ml végkoncentrációjú FasL (+M2) előtt adtuk a 10^6 db/ml koncentrációjú SKW6.4 sejtszuszpenzióhoz, majd 1 nap elteltével citofluoriméterrel mértük az apoptózist (subG1). Az ábrán a csak FasL által

okozott sejthalál százalékában (100%) ábrázoljuk a túlélőjelek intenzitását.

**** $p < 0,01$**

5.1.1.4. A BAFFR-Fas és a BCR-Fas jelpályák interakcióinak molekuláris analízise

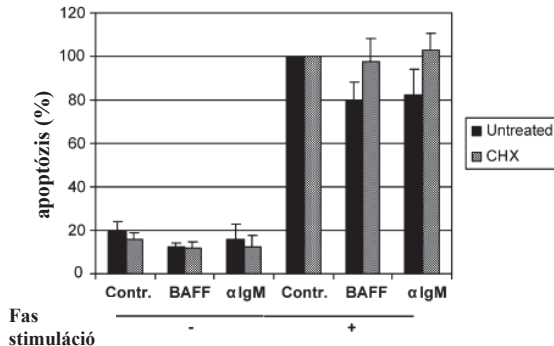
Mivel nem ismert, hogy a BAFFL hogyan módosítja a Fas indukált sejthalált, ennek molekuláris hátterét kívántuk tisztázni. Első lépésben megvizsgáltuk, hogy a BAFFL és az anti-IgM protektív hatása a Fas receptor expressziójának csökkenésével függ-e össze, ezért BAFFL vagy anti-IgM előkezelést követően a sejt felszíni Fas mennyiségét vizsgáltuk áramlási citofluoriméterrel (9. ábra). A hisztogram alapján megállapíthatjuk, hogy a Fas sejt felszíni expressziója nem változik BAFFL, illetve anti-BCR stimulációra, tehát a túlélést nem a sejthalál receptor mennyiségének csökkenése miatt tapasztaljuk.



9. ábra: A BAFFL és az anti-IgM stimulus nem változtatja meg a Fas receptor sejt felszíni expresszióját

A 10^6 db/ml koncentrációjú SKW6.4 sejtet 24 órán keresztül inkubáltuk 30ng/ml BAFFL-dal, vagy 10 μ g/ml anti-IgM-mel, illetve nélkülük, majd áramlási citofluoriméterrel mértük a Fas receptor mennyiségét a sejteken.

A CHX (cikloheximid) fehérjeszintézis gátló segítségével arra kerestük a választ, hogy a BAFF-közvetített megmentés fehérjeszintézisen keresztül valósul-e meg, hogy az antiapoptotikus fehérjék mennyiségének változásának van-e szerepe a túlélésben (10. ábra). Cikloheximid jelenlétében sem a BAFFR sem a BCR stimulálása nem csökkenti a Fas indukált apoptózist, ami arra utal, hogy hasonlóan az anti-IgM-hez, a BAFFL hatására bekövetkező megmentés is fehérjeszintézisen keresztül zajlik. Eredményeink alapján a fehérjeszintézishez lépcsőjéhez a BAFFL indukált jelsorozat később jut el, mint a BCR-kersztkötést követő jelek, mivel az apoptózistól való megmentés a sejtek 24 órás előkezelést igényeli BAFF-al, míg anti-IgM-mel 1 órás előkezelés is elegendő.



10. ábra: A BAFF szignál fehérjeszintézisen keresztül menti meg a humán SKW6.4 B-sejtet a Fas-közvetített apoptózistól

10⁶ db/ml koncentrációjú SKW6.4 sejthez a 24 órás BAFFL-os (30 ng/ml) illetve az 1 órás anti-IgM-es (10 µg/ml) kezelés előtt 1 órával 0,03 µg/ml cikloheximidet adtunk, majd 24 óráig 40 ng/ml FasL-dal (+M2) inkubáltuk, végül citofluoriméterrel meghatároztuk a subG1 fázisban lévő sejtek hányadát, az apoptózis mértékét. Az ábrán a csak FasL által okozott sejthalál százalékában (100%) ábrázoljuk a túlélőjelek intenzitását.

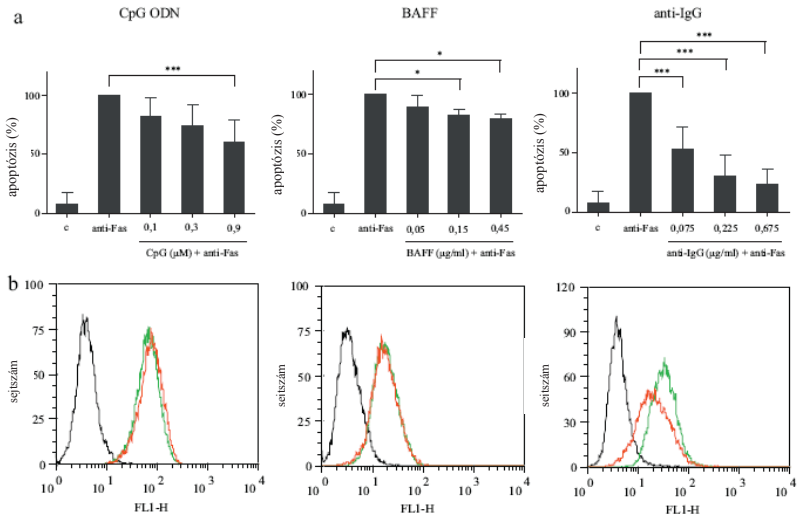
5.1.2. Egér A20 B-sejtvonalon végzett vizsgálatok

A BCR-közvetített megmentésről a legtöbb irodalmi adat A20 egér B-sejtvonal vizsgálataira vonatkozik. Ismert, hogy ezen sejtvonalon a BCR aktivációja fehérjeszintézistől függetlenül is megementi a sejteket a Fas-közvetített apoptózistól. Vizsgálatainkat ezért szerettük volna kibővíteni a széles körben használt egér A20 B-sejtekre. Ezen kívül kíváncsiak lettünk egy másik keveset vizsgált, potenciálisan túlélést is közvetítő TLR9 receptor szerepére is. Kísérleteink célpontjai így a Fas sejthalálreceptor, a BAFFR és a TLR-9 receptor voltak.

5.1.2.1. BAFF, CpG ODN és anti-BCR hatása a Fas indukált sejthalálra

Megvizsgáltuk, hogy egér A20 B-sejtvonalon a BCR-, a BAFFR-, valamint a TLR-9 receptor-közvetített jel hogyan befolyásolja az anti-Fas ellenanyaggal kiváltott apoptózist. A túlélőszignált generáló ligandumokat egy órával az anti-Fas stimulus előtt adva vizsgáltuk a Fas indukált apoptózis intenzitását. A 11.a ábrán látható, hogy már egy órás előkezelést követően, az anti-IgG-hez hasonlóan a BAFF és a CpG ODN is

dózisfüggően gátolja a Fas-közvetített apoptózist. A 11.b ábra alapján kijelenthetjük, hogy a gátlást nem a Fas receptor sejtfelszíni expressziójának csökkenése okozza.



11. ábra: TLR9, BAFF-R és BCR által közvetített szignál dózisfüggően megmenti az A20 B-sejtet a Fas-közvetített apoptózistól, miközben a Fas expresszió nem változik

(a) 10^6 db/ml A20 sejtet 1 órán keresztül aktiváltuk különböző koncentrációjú CpG ODN-dal, BAFF-al vagy anti-IgG-vel, majd 2 és fél órát inkubáltuk 100 ng/ml anti-Fas ellenanyag (JO2) jelenlétében, végül citofluoriméterrel mértük az apoptózist (subG1). Az ábrán a csak FasL által okozott sejthalál százalékában (100%) ábrázoljuk a túlélőjelek intenzitását.

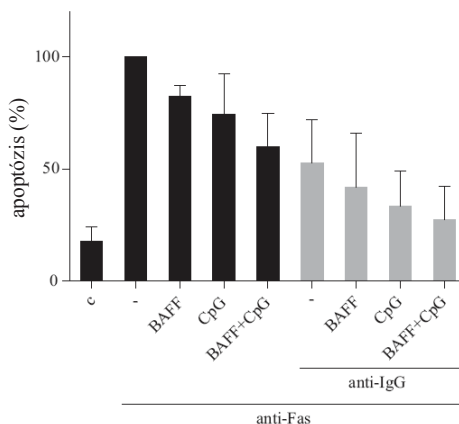
* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

(b) A Fas sejtfelszíni expresszióját 24 órás magas dózisú CpG ODN-dal, BAFF-al vagy anti-IgG-vel történő előkezelés után vizsgáltuk áramlási citofluoriméterrel. A jelöléshez JO2-FITC anti-Fas ellenanyagot használtunk, azzal vagy annak hiányában 30 percig inkubáltuk a sejteket. A hisztogramokon a fekete szín a jelölt anti-Fas ellenanyag nélküli negatív kontrollt, a zöld a nem kezelt sejtek Fas expresszióját, a piros az előkezelt minták Fas expresszióját jelzi.

Ezen kívül sem a BAFF, sem a CpG, sem az anti-IgG által indukált megmentést nem befolyásolja a CHX-es kezelés, azaz ezen folyamatokhoz nincs szükség új fehérjék szintéziséhez A20 egér B-sejtben (nem mutatott adat).

5.1.2.2. BAFF-al, CpG ODN-dal és anti-BCR-ral történő kostimuláció hatása a Fas-közvetített apoptózisra

Munkánk következő lépésében a BCR-on, a BAFFR-on, a TLR9-en és a Fas-on keresztül stimulált jelpályák közötti kölcsönhatásokat vizsgáltuk. A túlélést generáló ligandumokat önmagukban, illetve különböző kombinációkban a sejthez adva néztük az aktivált jelpályák esetleges együttműködését, a Fas indukált sejthaláltól való megmentés intenzitását. A ligandumokat a kísérlet során szuboptimális dózisban használtuk a 11.a ábrán meghatározott dóziszfüggés alapján. Megállapítottuk, hogy a három túlélő faktor növeli egymás hatását, kombinált alkalmazásuk nagyobb mértékű apoptózisgátlást eredményez, így a sejtek nagyobb hányada menekül meg a Fas-közvetített apoptózistól (12. ábra). Mind a CpG, mind a BAFFL fokozza az anti-IgG indukált túlélést, valamint erősítik egymás hatását is. A legintenzívebb túlélés a három receptor egyidejű aktivációjakor figyelhető meg.



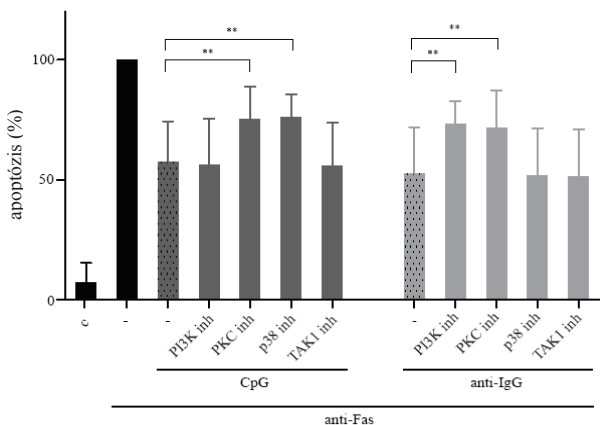
12. ábra: A CpG ODN, a BAFF és az anti-BCR növelik egymás apoptózist gátló hatását A20 egér B-sejtvonalon

10⁶ db/ml koncentrációjú A20 sejtuszpenziót előinkubáltunk 0,15 µg/ml BAFF-al, 0,3 µM CpG ODN-dal, illetve 0,074 µg/ml anti-IgG-vel, vagy ezek kombinációival, majd 2 és fél óráig 100 ng/ml-es anti-Fas ellenanyaggal

történő kezelést követően áramlási citofluoriméterrel detektáltuk az apoptózist (subG1). Az ábrán a FasL által okozott sejthalál százalékában (100%) ábrázoljuk a túlélőjelek intenzitását.

5.1.2.3. A CpG ODN és az anti-BCR indukált túlélés molekuláris mechanizmusa

Irodalmi adatok alapján a BCR-közvetített túlélő jelek pontos mechanizmusa részben tisztázott. Ismert, hogy a BCR, a PKC [59] és a PI3K [60] aktiválásán keresztül gátolja a Fas indukált apoptózist. Ezen molekulák gátlása a túlélőjel jelentős csökkenését idézi elő. A TLR9 és BCR által közvetített jelátviteli útvonalak upstream elemei teljesen eltérőek, így megvizsgáltuk, hogy a TLR9 jelátvitelében szereplő mely molekulák felelősek a túlélő szignálok létrejöttéért. A kardinális molekulák gátlásának hatására bekövetkező változások vizsgálata felvilágosítást adhat a túlélés molekuláris mechanizmusára, ezért PI3K, PKC, p38 és TAK1 inhibitorok hatását vizsgáltuk a CpG ODN és az anti-IgG által kiváltott Fas-közvetített apoptózistól való megmentésre (13. ábra). Eredményünk szerint a CpG által kiváltott megmentés PKC és p38 MAPK inhibitorral csökkenthető, de nem függ a PI3K aktivitásától. A BCR által közvetített túlélés az irodalmi adatoknak megfelelően PKC és PI3K függő, de a p38 inhibitor hatástalan. Elmondhatjuk tehát, hogy a BCR és a TLR9 receptor részben átfedő (PKC), részben eltérő (PI3K, p38) jelpályák aktivációján keresztül közvetítik apoptózist gátló hatásukat. Kísérleteinkben a TAK1 inhibitornak nem volt hatása a túlélésre.

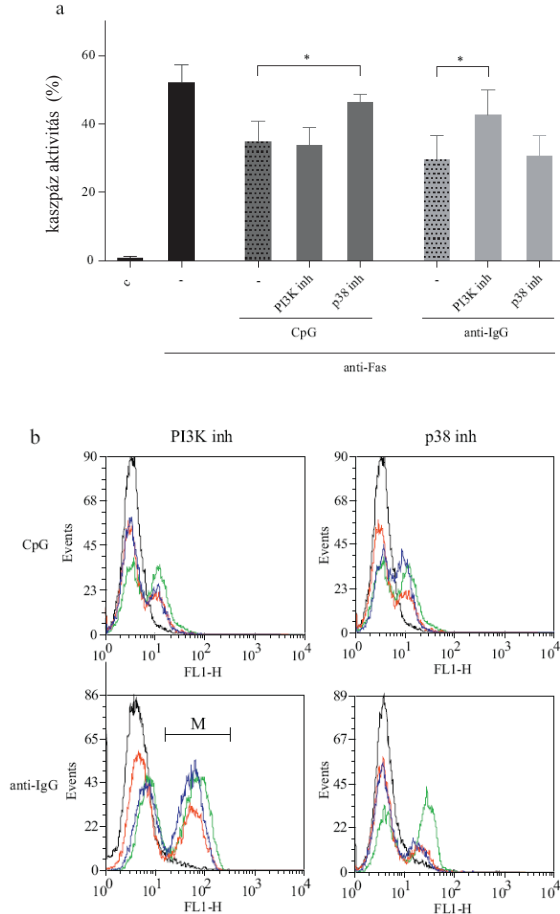


13. ábra: A BCR és a CpG részben átfedő, részben eltérő jelpályák aktivációján keresztül fejtik ki apoptózist gátló hatásukat A20 egér B-sejten

A túlélő faktorokat (0,9 μ M CpG ODN, 0,074 μ g/ml α -IgG) az inhibitorokkal (10 μ M PI3K, 1 μ M PKC, 20 μ M p38, 10 μ M TAK1) történő 30 perces előkezelés után adtuk a 10⁶ db/ml-es A20 sejthez, majd 1 órával azután a 100 ng/ml JO2 anti-Fas ellenanyagot. Az apoptózist 2 és fél óra elteltével mértük áramlási citofluoriméterrel. Az ábrán a csak FasL által okozott sejthalál százalékában (100%) ábrázoljuk a túlélőjelek intenzitását.

**** $p < 0,01$**

Az apoptózis folyamatában kaspázok aktiválódnak, mely következtében a sejt programozottan elpusztul. Az apoptózis mértékének vizsgálatát az előzőekben használt subG1 fázis meghatározása mellett kaspáz aktivitás detektálásával is elvégeztük. A sejthalál intenzitását ebben az esetben D2-R110 fluoreszcens kaspázszubsztráttal mértük áramlási citofluoriméter segítségével. A PI3K-os és a p38-as (a kétfajta túlélésre máshogy hatnak) inhibitoros kísérleteinket elvégeztük pan-kaspáz szubsztrát (D2-R110) alkalmazásával is. A 14.b ábrán reprezentatív példák mutatják a kaspázaktivitás változását különböző kezelések hatására. A kezeletlen sejthez képest az anti-Fas ellenanyaggal aktivált mintákban megnövekedett a kaspáz aktivitás, azaz elindult az apoptózis folyamata, amit a nagyobb intenzitású csúcsok jeleznek. A csúcsok alatti területek egymáshoz viszonyított értékéből lehet következtetni az apoptózis mértékének változására. A 14.a oszlopdiagramon láthatjuk ezen kísérletek számokban kifejezett eredményét. A Fas specifikus ellenanyag az A20 sejtek körülbelül 50%-ában okoz kaspázszubsztrát hasadást, azaz kaspázaktivitást, mely CpG ODN-os és anti-IgG-s kezelés hatására csökken. A p38 MAPK inhibitor növeli a kaspáz aktivitást CpG ODN jelenlétében, azaz csökkenti a CpG ODN-közvetített túlélést. A PI3K inhibitor az anti-IgG-vel okozott túlélést csökkenti, hasonlóan a subG1 módszerrel mért adatokhoz. Ezen kísérletek alapján is elmondhatjuk, hogy a TLR9 és BCR által közvetített Fas-sal szembeni túlélés molekuláris mechanizmusa részben eltérő, a CpG p38-függő, míg az anti-IgG PI3K-függő megmentést indukál.



14. ábra: Az anti-BCR és a CpG ODN indukált Fas-közvetített apoptózistól való megmenekülés molekuláris mechanizmusa kaspázaktivitás vizsgálatával A20 egér B-sejten

Az inhibitorokkal (10 μ M PI3K, 20 μ M p38) történő 30 perces előkezelés után adtuk a 10⁶ db/ml-es A20 sejthez a túlélő faktorokat (0,9 μ M CpG, 0,074 μ g/ml α -IgG), majd 1 órával azután a 100 ng/ml anti-Fas ellenanyagot. Az apoptózist D2-R110 floureszcens kaspázszubsztráttal mértük áramlási citofluoriméter segítségével. (a) Az oszlopok a kaspázaktív

*sejtek mennyiségét, %-át mutatják. * $p < 0,05$ (b) A fekete a kontroll mintákat, a zöld az anti-Fas-sal kezelt mintákat, a piros az anti-Fas-sal és túlélő jellel stimulált mintákat, a kék az inhibitorral is kezelt mintákat reprezentálja. A marker (M) mutatja a kaszpázaktiv sejtpopulációt.*

5.2. Szolubilis vezikula-kötött FasL által indukált sejthalál jellemzése

Munkánk második részében a vezikula-kötött FasL által kiváltott sejthalált tanulmányoztuk.

Irodalmi adatok alapján a PHA-val (phytohaemagglutinin) aktivált Jurkat T-limfociták, PBMC és melanóma sejtek felülűszói FasL-ot expresszáló partikulumokat tartalmaznak, és a target sejtek pusztulását indukálják [165-173]. A felülűszó citotoxicitása már 15 perccel a stimulációt követően detektálható, és anti-Fas neutralizáló ellenanyaggal csökkenthető [165, 166, 168, 169, 171]. A felülűszó ultracentrifugálását követően a toxikus aktivitást a pellet hordozza, valamint elektronmikroszkóppal, illetve Western blot módszerrel 50-200 nm átmérőjű FasL-ot expresszáló vezikula mutatható ki a PHA-val aktivált sejt felülűszójában [167, 170, 171]. A szolubilis mikrovezikula-kötött FasL PHA aktiváció mellett anti-CD3 [165, 173, 174] vagy PMA (phorbol myristic acid) + ionomicin [171] stimuláció hatására is megjelenik a felülűszóban.

Munkánk fő célja volt, hogy jellemezzük a FasL-ot expresszáló szekretált vezikula által indukált sejthalált, és összehasonlítsuk a 'klasszikus' rekombináns FasL-dal, anti-Fas ellenanyaggal és FasL-ot expresszáló B-sejttel kiváltott sejthalállal. Kísérleteink egyaránt kiterjedtek ezen sejthalál forma enzimatis, genetikai, morfológiai, valamint molekuláris karakterizálására.

5.2.1. PHA-val aktivált sejtek felülűszója által indukált sejthalál karakterizálása

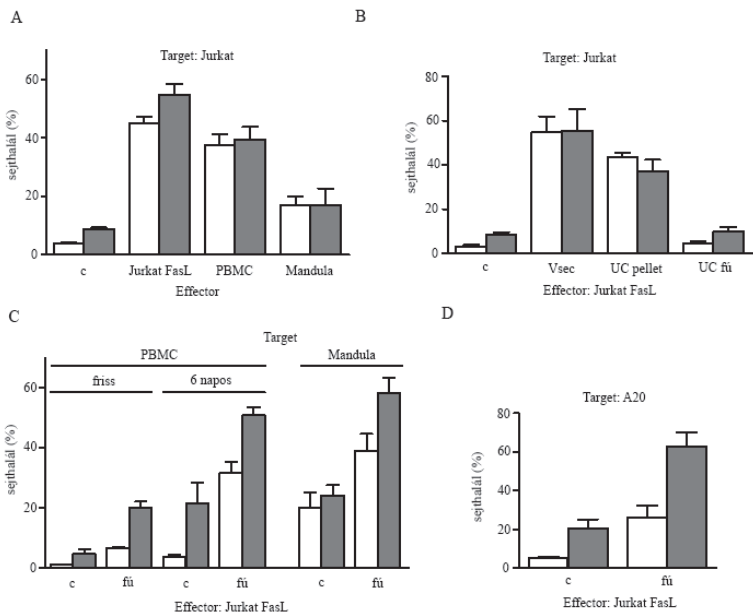
Kísérleti rendszerünkben 5 percig PHA-val aktiváltuk a felülűszót termelő sejteket. Ezt követően a sejteket 3-szor mostuk, ezáltal eltávolítottuk a felesleges PHA-t. Az aktivált sejteket 2 órán keresztül inkubáltuk, majd összegyűjtöttük a felülűszót. PHA-val aktivált mandula sejt, FasL-dal overexpresszált Jurkat Rapo T-sejtvonal és PBMC felülűszóival kezeltünk SVT35 Jurkat sejteket (15.A ábra). Mindhárom kezelés hatására a target sejtek intenzíven pusztulnak. A kísérletekben az apoptózisra jellemző subG1 populáció detektálása mellett a membránintegritás elvesztést is mértük (PI pozitív sejtek

detektálása alapján). A membrán áteresztőképesség megnövekedése a nekrotikus sejthalál formákra és a késői apoptózisra egyaránt jellemző. Az irodalmi adatoknak megfelelően a frissen izolált PBMC felülűszója, illetve a Jurkat sejtek felülűszója intenzív sejthalált okoz. Kimutattuk, hogy a PBMC felülűszó mind mennyiségileg, mind minőségileg (PI, subG1) hasonló sejthalált indukál, mint a FasL-dal overexpresszált Jurkat sejtvonal felülűszója. PHA-val aktivált, frissen szeparált humán mandula sejtek (80-90%-ban limfocita) felülűszója okoz ugyan sejtpusztulást, de jóval kisebb mértékűt, mint a PBMC és a Jurkat sejtvonal. A tény, hogy a PHA-val stimulált PBMC felülűszója jelentős sejthalált okoz, azt jelentheti, hogy a Vsec indukált sejthalálnak fiziológiásan is fontos szerepe lehet.

Annak érdekében, hogy megerősítést nyerjen az az állítás, hogy a mi *in vitro* kísérleti rendszerünkben is a szekretált vezikula okozza a sejthalált, a PHA-val aktivált Jurkat RapoFasL sejt felülűszóját leultracentrifugáltuk (15.B ábra). A reszuszpendált pellet szinte ugyan olyan citotoxicitási aktivitással bír, mint az eredeti felülűszó, ellenben az ultracentrifugálást követően képződött felülűszó nem okoz sejthalált, azaz elmodhatjuk, hogy kísérleteinkben szekretált vezikula okozza a target sejtek pusztulását.

A következőkben a primer sejteket, mint célsejteket is megvizsgáltuk. Frissen szeparált PBMC-t, 6 napig előaktivált PBMC-t és frissen szeparált mandula sejteket kezeltünk PHA-val aktivált FasL-ot overexpresszáló Jurkat sejtvonal felülűszójával (15.C ábra). A frissen szeparált PMBC szinte rezisztensnek mondható a Vsec kezelésre, minimális subG1-es és kicsi, bár szignifikáns PI-os sejthalál figyelhető meg. Irodalmi adatok szerint a 6 napos előaktiválást követően a PBMC szenzitívvé válik a Fas-közvetített sejthalálra [175]. Eredményeink szerint a 6 napos PBMC ehhez hasonlóan érzékennyé vált a felülűszó indukált sejthalálra is, a membrán áteresztővé vált (PI) és a subG1-es populáció mérete is megnőtt. A frissen izolált humán mandula sejtek esetében a felülűszó hatását nézve hasonlóan magas sejthalál detektálható, mint amekkora a 6 napig előaktivált T-sejt blasztonokon figyelhető meg.

Érdekes módon még az egér A20 B-sejtek is elpusztulnak a human Jurkat RapoFasL T-sejtvonal által termelt felülűszó hatására (15.D ábra).



15. ábra: A szekretált vezikula indukált sejthalál karakterizálása

(A) 5 percig 200 µg/ml PHA-val aktiváltuk a FasL-ot overexpresszáló Jurkat Rapo T-sejtet, a frissen izolált PBMC-t és mandula sejteket, majd 2 órán keresztül inkubáltuk friss médiumban. A felülszót SVT35 Jurkat sejtekre helyeztük, majd 1 nap elteltével mértük a sejtek pusztulását (PI, subG1).

(B) A PHA-val aktivált FasL-ot overexpresszáló Jurkat Rapo T-sejt felülszóját ultracentrifugáltuk. Az így keletkezett pelletet és felülszót 24 órára SVT35 Jurkat sejtekhez adtuk, majd mértük a sejthalált. Az 50 µl pelletet 450 µl médiumban vettük fel.

(C) Frissen szeparált PBMC-t, 6 nappal előaktivált PBMC-t (T sejt blasztot) és frissen szeparált mandula sejtet 24 órán át kezeltünk PHA-val aktivált FasL-dal overexpresszáló Jurkat Rapo sejt felülszójával, végül mértük a sejtpusztulást.

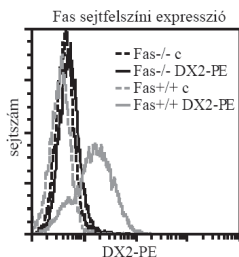
(D) PHA-val aktivált FasL-dal overexpresszált Jurkat Rapo sejt felülszójával A20 egér B-sejtet stimuláltunk 24 órán keresztül, végezetül mértük a sejtek pusztulását.

A sejthalált minden esetben a subG1 populáció nagysága és a membránintegritás elvesztésének (PI) meghatározásával áramlási fluoricitométerrel mértük.

A fehér oszlopok reprezentálják a subG1 fázisban lévő apoptotizáló sejteket, a szürke oszlopok pedig a membránintegritást elvesztő populációt (PI).

5.2.2. A vezikula indukált sejthalál Fas-függése

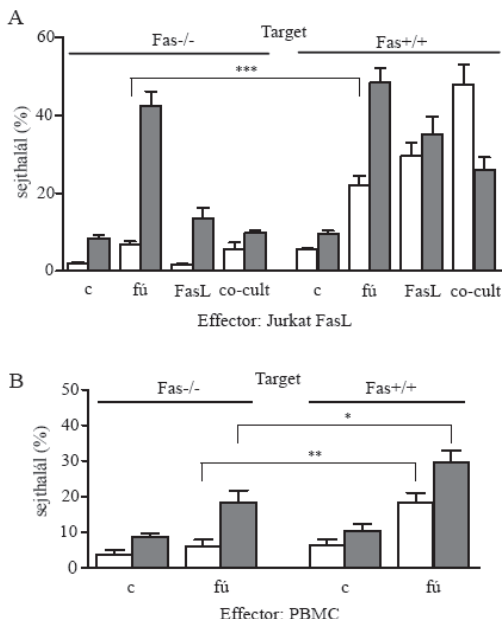
Különböző modellekben anti-Fas antagonistá használatával kimutatták, hogy az aktivált T-sejtek által termelt vezikula által okozott sejthalálban kulcs szerepe van a Fas receptornak [165, 166, 168, 173]. A Vsec-mal kiváltott sejthalál Fas-függésének vizsgálatához Fas-t expresszálo és Fas-t nem kifejező Jurkat Rapo sejtvonalpárt használtunk (16. ábra).



16. ábra: Fas+/+ és Fas-/- Jurkat Rapo sejtvonalak sejt felszíni Fas receptor expressziója
A sejtet 30 percig inkubáltuk DX-PE anti-Fas ellenanyaggal jégén, majd a receptorexpressziót áramlási citométerrel detektáltuk.

A Fas pozitív és Fas deficiens Jurkat Rapo sejteket PHA-val aktivált, FasL-ot overexpresszálo Jurkat sejtvonal felülszójával kezeltük (17.A ábra). Fas hiányában a Vsec nem indukál apoptotikus sejthalált (subG1), míg Fas jelenlétében az apoptózis folyamata lezajlik. A felülszó-közvetített apoptózis tehát Fas-függőnek bizonyul. Ugyanezt tapasztaltuk a klasszikus, azaz M2-vel keresztkötött rekombináns FasL által kiváltott sejthalál és co-culture (FasL-ot expresszálo B-sejt által sejt-sejt kölcsönhatáson keresztül indukált sejthalál) alkalmazása esetében is. A membrán áteresztőképességet (PI) vizsgálva azonban eltér a Vsec és klasszikus stimulusokra kapott válasz. Vsec hatására hasonlóan nagy PI pozitivitást figyelhetünk meg a Fas-/- és a Fas+/+ sejtek esetében is, annak ellenére, hogy a Fas-/- sejtekben nincs apoptózis. Eredményeink

szerint a felülúszó hatására a Fas-t nem expresszáló sejtek esetében a nem-apoptotikus sejthalál kompenzálja az apoptózis hiányát. FasL és co-culture stimulus használatakor ilyen kompenzációt egyáltalán nem figyelhetünk meg, Fas receptor hiányában a sejtek életképesek maradnak. Kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy a Vsec stimulus egyidejűleg indukál egy Fas-függő apoptotikus (subG1) sejthalált és egy Fas-független nem apoptotikus sejthalált, valamint hogy Fas hiányában a nem apoptotikus sejthalál kompenzálja az apoptózis hiányát. Ugyanezt az eredményt kaptuk PBMC-vel termeltetett felülúszó hatására, amikor is Fas jelenlétében apoptotikus és PI pozitív sejteket is megfigyeltünk, míg a Fas negatív sejtek esetében csak membrán áteresztőképesség növekedést detektáltunk (17.B ábra). Összeségében kimutattuk, hogy a szekretált vezikulum a Fas indukált apoptózis mellett Fas független, nem apoptotikus sejthalált is indukál.



17. ábra: Fas hiányában a Vsec nem okoz apoptózist, csak membrán áteresztőképesség növekedést

PHA-val aktiváltunk FasL-dal overexpresszált Jurkat Rapo T-sejtet (A), illetve PBMC-t (B), majd a felülúszóval, FasL+M2-vel és FasL-ot

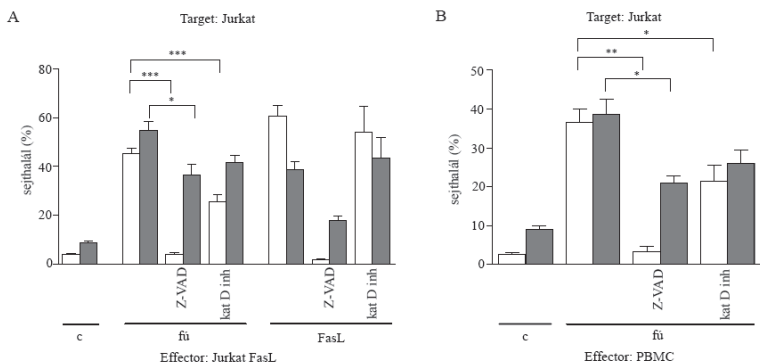
*expresszáló B-sejttel 24 órán keresztül stimuláltunk Fas^{-/-} és Fas^{+/+} Jurkat Rapo T-sejteket. Végül a sejthalált (PI, subG1) citofluoriméterrel detektáltuk. A fehér oszlopok reprezentálják a subG1 fázisban lévő apoptotizáló sejteket, a szürke oszlopok pedig a membránintegritást elvesztő populációt (PI). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$*

5.2.3. A felülúszóval kiváltott sejthalál enzimatikus és molekuláris háttere

5.2.3.1. Z-Vad és katepszin D inhibitor hatása a Vsec indukált sejthalálra

Első lépésként a Vsec indukált apoptotikus és nem-apoptotikus sejthalál enzimatikus hátterét tanulmányoztuk. Z-Vad pan-kaspáz inhibitorral kezeltük elő az SVT35 Jurkat target sejteket (18.A ábra). Az irodalomnak megfelelően a Z-Vad gátolja a FasL-M2 által kiváltott apoptózist. Ehhez hasonlóan a Z-Vad jelenléte, azaz a kaspázok gátlása blokkolja a Vsec indukált apoptózist (subG1). PI pozitív sejtek mindkét esetben továbbra is megfigyelhetők. Ez megerősíti azon eredményeket, miszerint kaspázgátlás esetében, Fas aktivációt követően kaspázfüggetlen sejthalálutak aktiválódnak [144]. Meglepetésünkre katepszin D inhibitor (pepszatin) használva különbséget figyeltünk meg a FasL-M2 és Vsec stimulus által okozott apoptózisban (18.A ábra). A FasL-M2 stimulussal ellentétben, a katepszin D gátlása szignifikánsan csökkenti a Vsec indukált apoptózist. Elmondhatjuk, hogy annak ellenére, hogy a Vsec által kiváltott apoptózis teljesen Fas-függő, a Vsec a rekombináns FasL-től enzimatikusan eltérő apoptotikus folyamatot eredményez. Pepsztatin hatására a membránintegritás csak kis mértékben változik (18.A ábra).

A 18.B ábra szerint PHA-val aktivált PBMC felülúszójának sejthalált indukáló hatását ugyanúgy gátolja a pan-kaspáz inhibitor és a katepszin D inhibitor, mint a Jurkat RapoFasL által termelt Vsec stimulus citotoxicitását. A Z-Vad, PBMC felülúszóval történő kezelést követően is teljesen blokkolja a subG1 apoptotikus sejthalált és részlegesen a PI pozitív sejtek mennyiségét. A katepszin D inhibitor szignifikánsan csökkenti a PBMC-től származó felülúszóval kiváltott subG1-gyel jellemzett apoptotikus populációt, és kismértékben redukálja a membránintegritás elvesztését is.



18. ábra: A katepszin D inhibitor szignifikánsan csökkenti a Vsec által kiváltott apoptózist

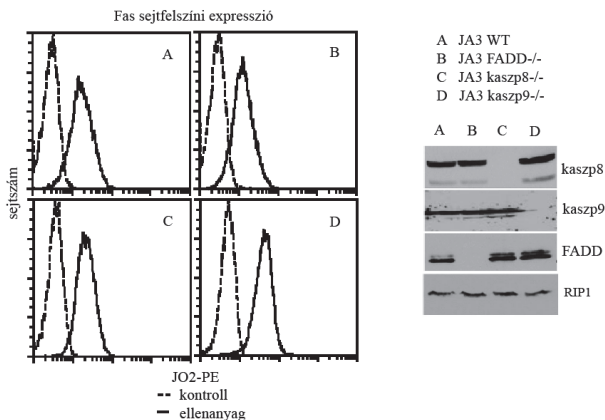
PHA-val aktiváltuk a FasL-dal overexpresszált Jurkat Rapo T-sejtet (A), illetve a PBMC-t (B). A target SVT35 Jurkat sejteket 10 μ M Z-Vad-os vagy 50 μ M katepszin D inhibitoros előkezelést követően a termeltetett felülúszóval vagy FasL-M2-vel stimuláltuk 24 órán keresztül. Végül a sejthalált (PI, subG1) citofluoriméterrel detektáltuk. A fehér oszlopok reprezentálják a subG1 fázisban lévő apoptotizáló sejteket, a szürke oszlopok pedig a membránintegritást elvesztő populációt (PI). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

A katepszin B inhibitor hatástalnnak bizonyult, nem gátolja a Vsec és FasL indukált sejthalált sem (nem mutatott adat).

Elmondhatjuk, hogy a Vsec enzimatisuk tulajdonságaiban eltérő apoptózist indukál, mint a FasL-M2. Annak ellenére, hogy az apoptotikus sejthalál mindkét esetben teljes mértékben Fas-függő, a klasszikus FasL-M2 stimulussal szemben, a Vsec indukált apoptosiz részlegesen katepszin D-függő. Tehát a két különböző Fas receptor aktiváció más enzimatisuk jelátviteli útvonalat eredményez.

5.2.3.2. FADD, kaszpáz-8 és kaszpáz-9 hiányának hatása a vezikula indukált sejthalálra

Tovább tanulmányozva a Vsec indukált sejthalál molekuláris hátterét, megvizsgáltuk a DISC-et alkotó fő fehérjék, a FADD, a kaszpáz-8, illetve a mitokondrium-közvetített útvonal iniciátor kaszpázának, a kaszpáz-9-nek a szerepét. A kísérletekben használt sejtvonalak, a JA3 Jurkat vad típus (WT), FADD $-/-$, kaszpáz-8 $-/-$ és kaszpáz-9 $-/-$ subklónok hasonló mennyiségű sejtfelszíni Fas receptort expresszálnak (19. ábra).



19. ábra: JA3 Jurkat sejtvonal sub-klónjainak Fas, FADD, kaszpáz-8 és kaszpáz-9 expressziója

(A) A sejtet 30 percig inkubáltuk DX-PE anti-Fas ellenanyaggal jégen, majd a Fas receptor expresszióját áramlási citométerrel detektáltuk. (B) SDS-PAGE és Western blot technikával a sejtek lizátát követően a teljes sejtlizátumból meghatároztuk a FADD, a kaszpáz-8, a kaszpáz-9 és kontrollként a RIP1 fehérjék jelenlétét.

A sub-klónokat keresztkötött FasL-dal, FasL-t hordozó B-sejttel, valamint PHA-val aktivált FasL-ot overexpresszáló Jurkat Rapo T-sejt felülúszójával kezeltük (20.A ábra). Az irodalomnak megfelelően FasL-M2 és co-culture stimulusra a FADD $-/-$ és a kaszpáz-8 $-/-$ sejtekben nem figyelhető meg apoptózis. A kaszpáz-9 $-/-$ sejtek esetében az apoptózis csak részlegesen gátolt. Részben hasonló, részben különböző molekuláris tulajdonságokat mutat a Vsec és a FasL-M2 stimulusok által indukált Fas-függő

apoptózis. Hasonlóság, hogy a kaszpáz-8 hiánya szinte teljesen, míg a kaszpáz-9 hiánya részlegesen, de nagy mértékben csökkenti a subG1 populációt. Különbőség, hogy meglepetésünkre a FasL-dal kiváltott apoptózissal ellentétben a FADD deficiencia csak kis mértékű gátlást eredményez a Vsec indukált apoptózisban. Eredményeink szerint a különböző enzimatis útvonalak mellett molekulárisan (FADD) is eltérő a rekombináns FasL és a Vsec által kiváltott Fas-függő apoptózis.

Azzal egybevágóan, hogy a Vsec indukált nem-apoptotikus szignál Fas-független folyamat, a membrán áteresztőképesség alig csökken kaszpáz-8 hiányában, és egyáltalán nem változik FADD, illetve kaszpáz-9 deficiens sejtekben. FasL, illetve co-culture stimulusok hatására PI pozitív sejthalál nem figyelhető meg FADD és kaszpáz-8 hiányában. Eredményeink alapján a Vsec stimulus egyidejűleg közvetít apoptotikus és nem apoptotikus sejthalált, míg a klasszikus Fas stimulusok csak apoptózist indukálnak. PHA-val aktivált PBMC által termelt felülúszóval kiváltott sejthalál molekuláris háttere részben eltér (FADD-függés subG1-ben, kaszpáz-9-függés PI-ban) a Jurkat felülúszó által indukált sejthaláltól (20.B ábra). A Jurkat RapoFasL sejttel kiváltott sejthalálhoz hasonlóan, a PBMC-ből származó szekretált vezikulával kiváltott apoptózist nagymértékben gátolja a kaszpáz-8 és a kaszpáz-9 hiánya. Másik oldalról, PBMC felülúszó használata esetén a FADD deficiencia apoptózissal szembeni rezisztenciát okoz. Szintén különbséget kaptunk a membránintegritást tekintve. Kísérleteink szerint a kaszpáz-8 kiütésének nincs hatása a PBMC-vel termelt Vsec indukált PI pozitivitásra, a FADD hiánya viszont növeli a PI pozitív sejtek hányadát. Az egyik legmarkánsabb különbség a Jurkat illetve PBMC felülúszó hatásában, hogy a PBMC felülúszó hatására a kaszpáz-9 deficiens sejtekben PI pozitív sejtpopuláció nem detektálható, szemben a Jurkat felülúszó hatásával.

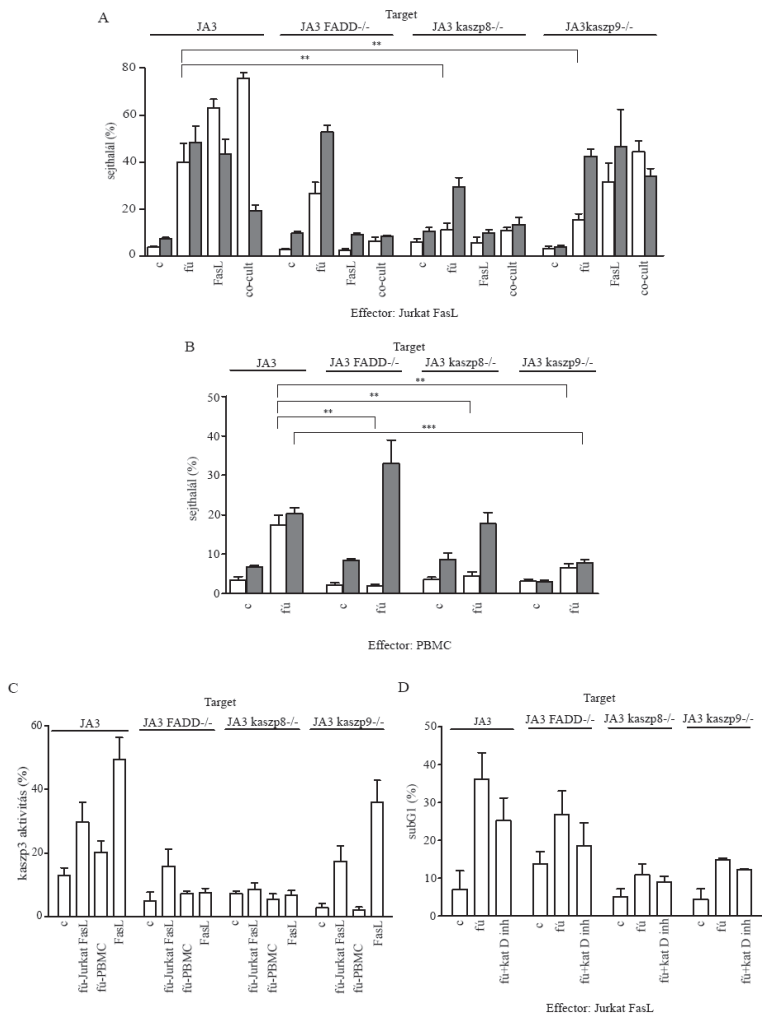
Annak megerősítésére, hogy a Vsec által indukált apoptózis Fas-függő, de FADD-független, hogy a subG1 pozitivitással jellemzett sejthalál valóban apoptózis, a subG1-es populáció mérése mellett megvizsgáltuk a kaszpáz-3 aktivációt is (20.C ábra). Rekombináns, kereszt kötött FasL-dal és PBMC által termelt felülúszóval stimulált sejtek esetében azt tapasztaltuk, hogy ahogy nincs subG1-es populáció a FADD deficiens sejtekben, úgy nincs kaszpáz-3 aktivitás sem ezen sejtekben. Amennyiben PHA-val aktivált FasL-dal overexpresszált Jurkat Rapo sejt felülúszójával kezeltük a sub-klónokat, a FADD -/- Jurkat sejtekben a subG1-es apoptózis mellett egyértelmű kaszpáz-3 aktivitást detektáltunk. Ennek az eredménynek megfelelően a Fas-függő és

FADD független subG1-es sejthalál nagy mértékben (bár nem teljesen) gátolható Z-Vad pan-kaspáz inhibitorral (nem mutatott adat).

Effektor kaspázaktivitás megfigyelhető a kaspáz9 +/- sejtekben is rekombináns FasL és Vsec stimulusra egyaránt, de aktivált PBMC által termelt felülűszó hatására nem (20.C ábra).

Azon kérdés tisztázására, hogy a katepszin D felelős -e a FADD-független apoptózisért, megvizsgáltuk, hogy a katepszin D inhibitornak milyen hatása van a FADD/- sub-klónt stimuláló, PHA-val aktivált Jurkat sejt felülűszójának apoptotikus hatására (20.D ábra).

A pepsztatin FADD hiányában csökkenti az apoptózist, azaz a FADD-független apoptózis részben katepszin D-függő folyamat.



20. ábra: A FADD, a kaszpáz-8, illetve a kaszpáz-9 szerepe a Vsec indukált sejthalálban

WT, FADD^{-/-}, kaszpáz-8^{-/-} és kaszpáz-9^{-/-} sejtekben váltottunk ki sejthalált rekombináns FasL-dal (20 ng/ml), FasL-ot overexpresszáló B-sejtet, illetve 5 percig PHA-val aktivált FasL-ot overexpresszáló Jurkat Rapo sejt (A) és

PBMC (B) felülűszojával. (D) 10µM pepsztatinnal előkezeltük a sub-klónokat, majd a PHA-val aktivált Jurkat RapoFasL felülűszojával stimuláltuk a target sejteket. A sejtpusztulást 24 óra elteltével áramlási citométerrel detektáltuk, a fehér oszlopok reprezentálják a subG1 fázisban lévő apoptotizáló sejteket, a szürke oszlopok pedig a membránintegritást elvesztő populációt (PI).

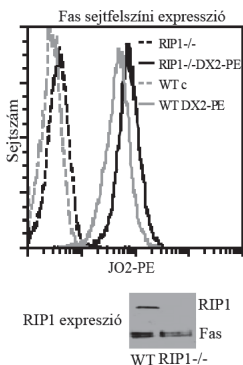
(C) Citofluoriméterrel megvizsgáltuk a target sub-klónok kaszpáz-3 aktivitását FasL-M2 (20 ng/ml), Jurkat RapoFasL-dal és PBMC-vel termelt felülűszo hatására.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.2.3.3. A felülűszo-közvetített sejthalál RIP-függése

Irodalmi adatok szerint a membránkötött FasL-dal (memFasL) kiváltott sejthalál végbemeneteléhez elengedhetetlen a RIP1 molekula jelenléte [163].

Kíváncsiak voltunk, hogy a Vsec indukált sejthalál vajon függ-e a RIP1 fehérjétől. Vizsgálatainkat RIP1 negatív és RIP1 pozitív Jurkat sejtekkel végeztük. A kísérleteinkben használt RIP1^{-/-}, illetve RIP1^{+/+} Jurkat T-sejtvonalakon a Fas receptor expresszió hasonló volt (21. ábra).



21. ábra: SVT35 Jurkat sejtvonal és RIP1 negatív sub-klónjának Fas és RIP1 expressziója

A sejtelleletet 30 percig inkubáltuk DX-PE anti-Fas ellenanyaggal jégen, majd a Fas receptor expresszióját áramlási citométerrel detektáltuk. SDS-PAGE és Western blot technikával a sejtek lizálását követően meghatároztuk a RIP1 és kontrollként a Fas fehérje jelenlétét.

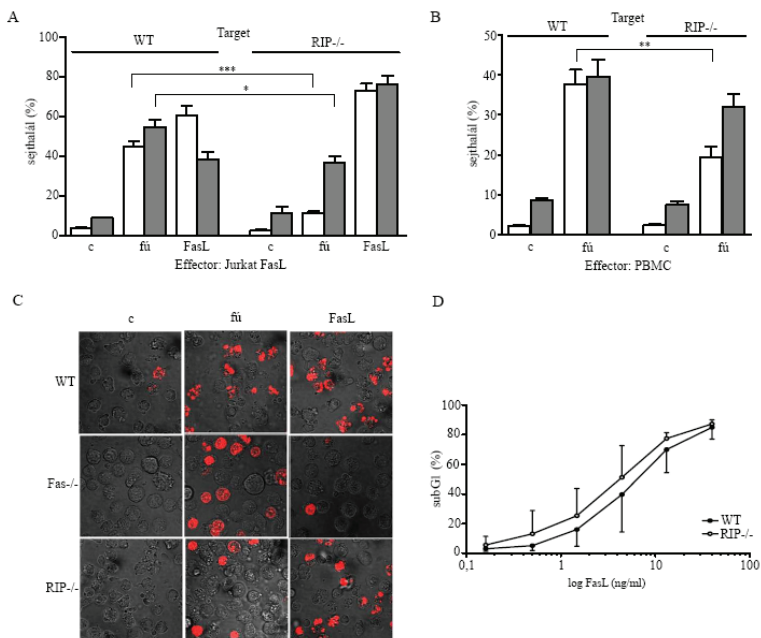
RIP1 negatív és pozitív SVT35 Jurkat T-sejtet stimuláltunk PHA-val aktivált Jurkat RapoFasL citotoxikus felülűszojával (22.A ábra). A Vsec RIP1 hiányában nem vált ki intenzív apoptózist, míg a RIP1-et expresszáló target sejtből igen. A RIP1 deficiens sejtekben a Vsec indukált apoptózis hiánya a felülűszo dózisától és a sejthalál indukció kinetikájától függetlenül mindig alacsonyabb volt, mint a vad típusú sejtek esetében.

Megvizsgálva a membránintegritás változását, a Vsec indukált nem apoptotikus sejthalál RIP1 hiányában is detektálható. Esszerint a Vsec-mal kiváltott apoptózis, szemben a FasL-M2 stimulussal, RIP1-függő jelátviteli kaszkádot aktivál.

Hasonló eredményt kaptunk PBMC-t használva felülűszót termelő sejtként, de ebben az esetben a RIP1 hiánya kisebb mértékű sejthalálcsökkenést okoz (50% subG1 gátlás 75% helyett, 10% PI gátlás 35 % helyett) (22.B ábra).

A Vsec indukált sejthalál folyamat további jellemzésére fluoreszcens konfokális mikroszkópot használtunk, amivel PI felvétel detektálásával megvizsgáltuk a PHA-val aktivált FasL-dal overexpresszált Jurkat Rapo T-sejt által termelt vezikula okozta sejthalál morfológiáját (22.C ábra). Célsejtként vad típusú, Fas-/- és RIP-/- sejtek szolgáltak. Fas-t és RIP1-et is expresszálo SVT35 Jurkat T-sejtet stimuláltuk keresztkötött, rekombináns FasL-dal vagy Jurkat RapoFasL által termelt szekretált vezikulával. Mindkét kezelés eredményez PI felvételt, mely segítségével főként sejttag fragmentációt figyelhetünk meg. Fas deficiens sejtekben a FasL-M2 a sejthalál méréseknek megfelelően nem okoz PI fölvételt, viszont a felülűszó igen, mely sejtek morfológiája a nekroziséhoz hasonló. Ez megerősíti azt, hogy a Vsec okoz nem apoptotikus sejthalált is, Fas jelenlétében azonban az apoptotikus sejthalál dominál. RIP1 hiányában, hasonlóan a Fas-/- sejtekhez, a sejthalálforma morfológiája különbözik a FasL-M2 és Vsec által elpusztított sejtekben. A Vsec stimulus kevésbé intenzív sejthalát okoz főként nekrozisra jellemző megjelenési formával, amikor a mag nem fragmentálódik, míg FasL-M2-re a sejtpusztulás apoptotikus képet mutat.

Ezen eredmények demonstrálják, hogy a Vsec indukált sejthalálban, hasonlóan a Fas expresszióhoz, a RIP1 jelenléte is az apoptózis folyamatának végbemenetelét támogatja a nekroptózissal szemben. Azaz a RIP1-nek a Fas-hoz hasonlóan alapvető szerepe van a szekretált vezikula által indukált apoptózisban. A Vsec indukált sejthalál folyamatokban a két molekula bármelyikének hiánya nekroptózishoz vezet, míg jelenlétükben az apoptózis az elsődleges sejthalál forma.



22. ábra: A RIP1 hiánya gátolja a Vsec indukált apoptózist

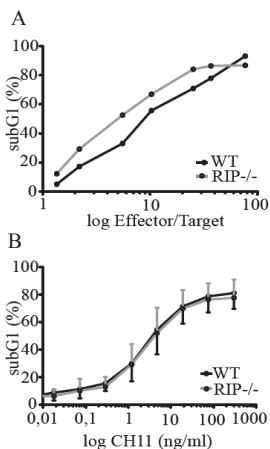
FasL-dal overexpresszált Jurkat Rapo T-sejtet (A), illetve frissen szeparált PBMC-t 5 percig PHA-val aktiváltunk. RIP1^{-/-} és RIP1^{+/+} SVT35 Jurkat sejtet kezeltük a PHA-val aktivált sejt felülűszojával vagy M2-vel keresztkött rekombináns FasL-dal (20ng/ml). 24 óra elteltével áramlási citofluoriméterrel mértük az apoptózist (subG1, fehér oszlopok) és a PI pozitívítást (szürke oszlopok).

(C) A vad típusú, a Fas^{-/-} és a RIP1^{-/-} Jurkat sejteket stimuláltuk FasL-M2-vel, illetve PHA-val aktivált FasL-ot overexpresszált Jurkat sejt felülűszojával. 16 óra múlva konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a PI-felvételt.

(D) A RIP1^{-/-} és a RIP1^{+/+} Jurkat sejtek pusztulását néztük különböző dózisú keresztkött rekombináns FasL stimulusra. 24 óra múlva áramlási citométerrel mértük az apoptózist (subG1).

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Eredményeink arra világítanak rá, hogy a RIP1 fő regulátorként funkcionál a Vsec-indukált Fas-függő apoptózisban, de nincs szerepe a rekombináns FasL indukált apoptózisban. Ahhoz, hogy tisztázzuk a RIP1 szerepét a Fas-közvetített apoptózisban, megvizsgáltunk különböző Fas-közvetített sejthalált okozó stimulusok RIP1 függését. Különböző kezelések hatását néztük az SVT35 Jurkat T-sejtre. Sejtpusztulást váltottunk ki keresztkötött FasL-dal (22.D ábra), FasL-ot expresszáló humán B-sejttel sejt-sejt kölcsönhatás segítségével (23.A ábra) és anti-Fas agonista ellenanyaggal (23.B ábra). Az irodalmi adatokkal egybevágóan szuboptimális mennyiségű FasL-M2 stimulusra a RIP1^{-/-} sejtek kicsit nagyobb arányban pusztulnak, mint a RIP1^{+/+} sejtek (23.D ábra). (Szemben a RIP1 hiányában megfigyelhető csökkent apoptózissal Vsec stimulust követően.) Ehhez az eredményhez hasonlólt tapasztaltunk mikor FasL-ot a felszínén hordozó WSU B-sejttel váltottuk ki az apoptózist (a FasL-t nem expresszáló WSU nem okozott sejtpusztulást), a RIP1 hiánya ebben az esetben is egy kicsit megnövelte az apoptózist, bár a változás nem volt szignifikáns. Ezt egy reprezentatív példán keresztül mutatja be a 23.A ábra. Az anti-Fas (CH11) stimulus hatását nem befolyásolja a RIP1 molekula hiánya, illetve jelenléte (23.B ábra). Kísérleteink alapján elmondhatjuk, hogy a RIP1 hiánya nincs szignifikáns hatással a FasL-M2, az anti-Fas ellenanyag és a co-culture által kiváltott apoptózisra. Ezek az eredmények megerősítik a RIP1 nélkülözhető szerepét a nem vezikula indukált, klasszikus, széles körben használt stimulusok által kiváltott Fas-közvetített apoptózisban. Másik oldalról a RIP1 kétségkívül szükséges a Vsec indukált Fas-függő apoptózishoz.



23. ábra: RIP1 hiányának hatása a FasL-ot hordozó B-sejt által és az anti-Fas ellenanyaggal kiváltott apoptózisra

(A) RIP1^{-/-} és vad típusú SVT35 Jurkat sejtet inkubáltunk együtt különböző arányban FasL-ot expresszáló humán WSU B-sejttel. 24 óra múlva áramlási citométerrel mértük az apoptózist (subG1).

(B) A RIP1^{-/-} és vad típusú SVT35 Jurkat sejtek pusztulását vizsgáltuk különböző dózisu anti-Fas ellenanyag (CH11) stimulusra. 24 óra múlva áramlási citométerrel mértük az apoptózist (subG1).

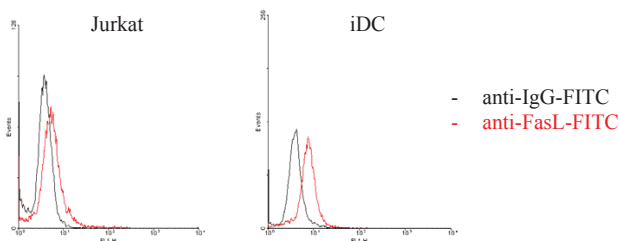
Összeségében mind morfológiai, mind enzimatis (katepszin D és kaszpáz-függés) mind genetikai, illetve molekuláris (RIP-, Fas- és FADD-függő) változásokat vizsgáló módszerekkel bizonyítottuk, hogy a FasL-ot hordozó szekretált vezikulum indukált sejthalál folyamata jelentősen eltér a 'klasszikus' Fas receptor aktivációval kiváltott sejthaláltól.

5.2.4. A dendritikus sejt szerepe a felülúszó indukált sejthalálban

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a dendritikus sejtek intracellulárisan expresszálnak FasL-ot [176], képesek exoszóma termelésre [177], valamint különböző stimulációkat követően felülúszójuk citotoxikus tulajdonságot hordoz [178-180]. Megvizsgáltuk a dendritikus sejtek szerepét a felülúszó indukált sejthalálban.

5.2.4.1. A dendritikus sejt, mint sejtpusztító felülúszót termelő sejt

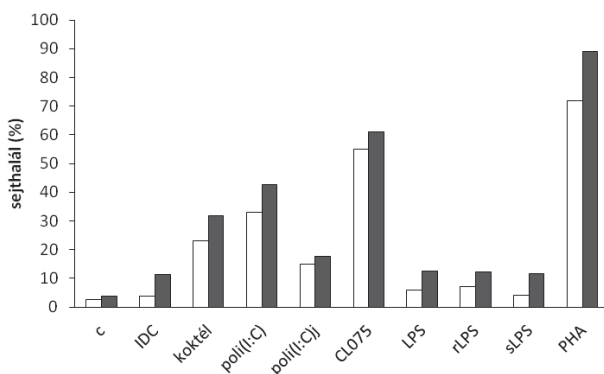
Eredményeink alapján, összhangban a már közölt adatokkal, az éretlen dendritikus sejtek (iDC) intracellulárisan expresszálnak FasL-ot (24. ábra). Sejtfelszíni FasL expresszió azonban nem volt kimutatható (nem mutatott adat). Ahogy a 24. ábra is mutatja, az éretlen dendritikus sejtek intracelluláris FasL expressziója akár meg is haladhatja a T sejtekét, vagy a Jurkat T-sejtvonalét.



24. ábra: SVT35 Jurkat T-sejt és monocitából differenciáltatott éretlen dendritikus sejtek intracelluláris FasL expressziója

Fixálást és permeabilizálást követően a sejtpelletet 30 percig inkubáltuk FITC-cel jelölt NOK-1 anti-FasL ellenanyaggal jégen, majd az expressziót áramlási citométerrel detektáltuk. A fekete vonal a kontrollt, a piros a jelzett mintát reprezentálja.

Ezek után kíváncsiak voltunk, hogy a FasL-ot intracellulárisan expresszáló éretlen DC képes-e citotoxikus felülűsző termelésére. Az éretlen dendritikus sejtekhez különböző aktivátoraikat - Toll receptor ligandumokat, mint poli(I:C)-t (TLR3 ligand), LPS-t (TLR4 aktivátor), CL075-öt (TLR7-8 ligand), citokinkoktét, vagy PHA-t - adtuk, majd vizsgáltuk az általuk termelt felülűsző sejthalált indukáló hatását SVT35 Jurkat T-sejten (25. ábra). Amennyiben az iDC-t poli(I:C)-vel, CL075-tel, PHA-val, illetve citokinkoktállal aktiváltuk, a dendritikus sejtek által termelt felülűsző a Jurkat T-sejtek egy részét elpusztította. Tehát elmondhatjuk, hogy különböző aktivációkra az éretlen DC felülűszőja sejthalált okoz.

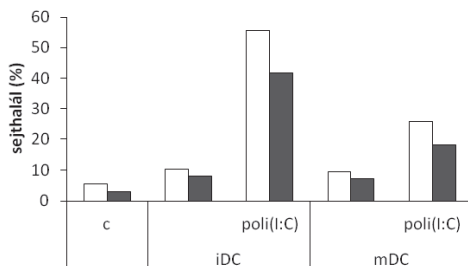


25. ábra: Az aktivált éretlen dendritikus sejt felülűszőja stimulusfüggően citotoxikus hatása

Monocitából differenciáltatott éretlen dendritikus sejteket 15 percig aktiváltunk citokin koktállal, poli(I:C)-vel (25 µg/ml), CL075-tel (1 µg/ml), LPS-sel (100 ng/ml), rLPS-sel (100 ng/ml), sLPS-sel (100 ng/ml) és PHA-val (200 µg/ml), majd a termelt felülűszőval stimuláltuk az SVT35 Jurkat T-sejteket. Kontrollként a poli(I:C) stimulációt jégen is elvégeztük (poli(I:C)j). 24 óra elteltével áramlási citofluoriméterrel mértük az apoptózist (subG1, fehér oszlopok) és a PI pozitívítást, azaz a membránintegritás csökkenését (szürke oszlopok).

Irodalmi adatok alapján az érett dendritikus sejtek, szemben az éretlen sejtekkel, nem rendelkeznek citotoxikus tulajdonsággal [180]. Megvizsgáltuk, hogy a poli(I:C)-vel

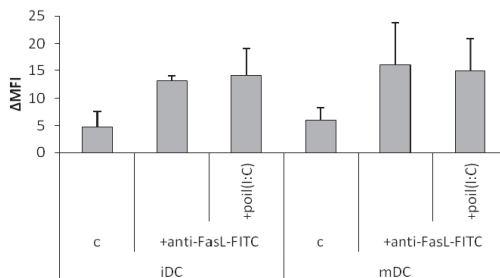
aktivált érett és éretlen dendritikus sejtek felülűszőjának sejtpusztító hatása között van – e különbség (26. ábra). Az aktivált éretlen DC felülűszőja jóval nagyobb mértékben váltja ki az SVT35 Jurkat sejtek pusztulását, mint a poli(I:C)-vel aktivált érett DC felülűszőja. Más szóval az immunrendszerben tolerogén szerepet betöltött aktivált iDC felülűszőja fokozottabban indukál sejthalált, mint az immunstimuláns mDC felülűszőja. Az aktiválatlan dendritikus sejt felülűszőja nem rendelkezett citotoxikus aktivitással.



26. ábra: A poli(I:C)-vel aktivált éretlen dendritikus sejt felülűszőjának citotoxicitása nagyobb, mint az érett dendritikus sejté

Poli(I:C)-vel (25 µg/ml) aktivált monocitából differenciáltatott éretlen és érett dendritikus sejtek felülűszőjával stimuláltunk 24 órán keresztül SVT35 Jurkat T-sejteket, majd áramlási citométerrel detektáltuk a sejtpusztulást. A fehér oszlopok reprezentálják a subG1 fázisban lévő apoptotizáló sejteket, a szürke oszlopok pedig a membránintegritást elvesztő populációt (PI).

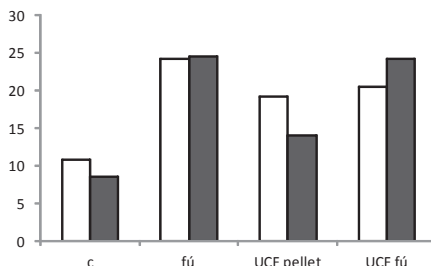
Fontosnak tartottuk annak a kérdésnek a tisztázását, hogy a poli(I:C)-vel történő aktiválás hatására változik –e a FasL intracelluláris expressziója az érett és éretlen dendritikus sejtekben. A 27. ábra egyértelműen mutatja, hogy poli(I:C) stimulusra a dendritikus sejtekben nem változik a FasL mennyisége.



27. ábra: Érett és éretlen dendritikus sejtek intracelluláris FasL expressziója poli(I:C) stimulust követően

Poli(I:C)-vel történő aktiválást, fixálást és permeabilizálást követően a sejt pelletet 30 percig inkubáltuk NOK-1 anti-FasL ellenanyaggal jégen, majd az expressziót áramlási citométerrel detektáltuk. ΔMFI: minta-kontroll fluoreszcencia érték

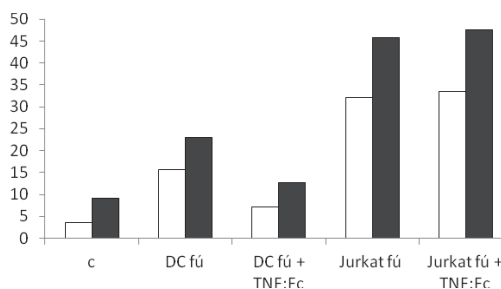
Abból a célból, hogy megvizsgáljuk, hogy a poli(I:C)-vel aktivált éretlen dendritikus sejt által termeltetett felülúszóban mi okozza a citotoxicitást, a felülúszót ultracentrifugáltuk (28. ábra). Célséjként SVT35 Jurkat sejtet használtunk. A PHA-val aktivált FasL-dal overexpresszált Jurkat Rapo T-sejt felülúszóval ellentétben, a poli(I:C)-vel aktivált iDC felülúszóját ultracentrifugálva, mind a pellet, mind az új felülúszó rendelkezik sejtpusztító hatással.



28. ábra: A poli(I:C)-vel aktivált éretlen dendritikus sejt felülúszójának ultracentrifugálását követően mind a pelletnek, mind a felülúszónak marad citotoxikus hatása

A poli(I:C)-vel aktivált monocitából differenciáltatott éretlen dendritikus sejt felülűszóját először 15000 rpm-en 10 percen keresztül centrifugáltuk, majd az így keletkezett felülűszót 2 órán át 70000 g-n ultracentrifugáltuk, s az így képződött pelletet felvettük médiumban és mindkét frakcióval sejthalált indukáltunk. A fehér oszlopok reprezentálják a subG1 fázisban lévő apoptotizáló sejteket, a szürke oszlopok pedig a membránintegritást elvesztő populációt (PI).

A TNFR1 és ligandja, a TNF α összekapcsolódása az NF- κ B aktiválódás mellett apoptózishoz is vezethet. Megvizsgáltuk, hogy a TNFR1 milyen szerepet játszik a felülűszóval kiváltott sejthalál folyamatokban. TNFR1:Fc hatását vizsgáltuk a poli(I:C)-vel aktivált monocitából differenciáltatott dendritikus sejt felülűszójával és a PHA-val aktivált FasL-dal overexpresszált Jurkat T-sejt felülűszójával kiváltott sejthalálra (29. ábra). A TNFR1:Fc fehérje az IgG1 Fc részével fúzionáltatott TNFR1 extracelluláris domén, mely hozzákapcsolódik a TNF α -hoz, s így gátolja a receptor és természetes ligandjának interakcióját. Célsejtként az SVT35 Jurkat T-sejtvonalat szolgált. Abban az esetben, ha a FasL-dal overexpresszált Jurkat Rapo sejtvonalat PHA-val aktiváltunk, akkor a TNFR1 antagonista nem befolyásolta a felülűszó közvetített sejthalált. Ugyanakkor, poli(I:C)-vel stimulált iDC felülűszójának sejtpusztító tulajdonsága csökkenthető a TNFR1 blokkolásával. Elmondhatjuk, hogy míg a Jurkat T-sejt felülűszójának citotoxikussága nem TNFR1-függő, addig a dendritikus sejté igen.



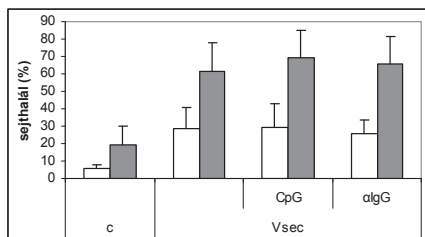
29. ábra: Az éretlen DC poli(I:C)-vel történő aktiválásának hatására képződött felülűszó által okozott sejthalál TNFR1-függő

Poli(I:C)-vel aktiváltunk monocitából differenciáltatott éretlen dendritikus sejteket, vagy PHA-val stimuláltunk FasL-dal overexpresszált Jurkat T-sejteket,

majd TNFR1:Fc (200ng/ml) előkezelést követően a felülúszóval SVT35 Jurkat T-sejteket stimuláltuk 24 órán keresztül. Végül a sejthalált citofluoriméterrel detektáltuk. A fehér oszlopok reprezentálják a subG1 fázisban lévő apoptotizáló sejteket, a szürke oszlopok pedig a membránintegritást elvesztő populációt (PI).

5.3. CpG, anti-BCR hatása a vezíkula-közvetített sejthalálra

Az általunk leírt Vsec indukált sejthalál-mechanizmus jelentős hatással lehet a B-sejt szelekcióra is, mivel vizsgálataink szerint A20 B-sejtvonalon a Vsec-mal előidézett sejthalált nem csökkentették sem a sejtfelszíni immunglobulin, sem a CpG indukált túlélő szignálok, szemben a közvetlen T-sejt/B-sejt kapcsolatot modellező anti-Fas ellenanyaggal kiváltott sejthalállal (33. ábra).



30. ábra: A CpG ODN és az anti-BCR nem befolyásolják a Vsec indukált sejthalált A20 egér B-sejtvonalat előkezeltük CpG ODN-dal (0,3 μ M) vagy anti-IgG-vel (0,074 μ g/ml), majd 1 óra elteltével sejthalált váltottunk ki bennük FasL-dal overexpresszált Jurkat Rapo sejtéből származó felülúszóval. A fehér oszlopok reprezentálják a subG1 fázisban lévő apoptotizáló sejteket, a szürke oszlopok pedig a membránintegritást elvesztő populációt (PI).

6. Megbeszélés

A Fas-közvetített apoptózis kulcsszerepet játszik a normál immunválaszban és az autoreaktív B-sejtek eliminálásában [28, 181, 182]. Normál esetben a limfociták fejlődése és az antigén specifikus válasz közben az autoreaktív sejtek elpusztulnak. A nyugvó B-sejtek nem expresszálnak Fas sejthalál receptort, a fehérje a germinális centrumban, a CD40-en keresztül érkező jel hatására jelenik meg a B-sejteken, mellyel a B-sejt szenzitívvé válik a Fas-közvetített sejthalálra [183]. Ha a Fas-hoz hozzákapcsolódik a liganduma, akkor a B-sejt programozottan, apoptózissal elpusztul, hacsak nem kap túlélő jelet a BCR-en keresztül [1, 34, 38, 164, 184, 185], illetve az IL-4 által [51, 52]. A B-sejt receptoron érkező szignál eddigi tanulmányok alapján a Bcl-2/Bcl-xl [186], a FLIP vagy a FAIM [56] fehérjék expresszióinak fokozásával, a kaspáz-8 asszociációjának és hasadásának blokkolásával [58, 187], valamint a Fas és FADD molekulák összekapcsolódásának megakadályozásával [15] gátolja az apoptózist. A túlélést közvetítő receptorok, így a BAFFR is okozhat Fas rezisztenciát a GC B-sejtekben, amennyiben liganduma fiziológiásnál magasabb koncentrációban van jelen. Ez a folyamat szerepet játszik egyes autoimmun betegségeknél, pl SLE, RA esetében [80, 88, 188, 189]. A BAFF hiánya több, mint 90% érett B-sejt elvesztést jelent, míg overexpressziója megnövekedett B-sejt számot eredményez, ami autoreaktív B-sejtek kialakulásához vezet [76, 79, 80, 85]. A BAFF szignál gátolhatja a Fas-közvetített apoptózist, vagy erősítheti a BCR-en keresztül érkező túlélő jelet. Ezen két modulációnak különböző hatásai lehetnek: a Fas-közvetített sejthalál gátlásával a BAFF növelheti a „bystander” B-sejtek túlélését, másrészt a BCR-közvetített túlélés növelésével támogathatja az antigén specifikus klónokat. Irodalom szerint a BAFF gátolhatja az autoreaktív B-sejtekben a BCR indukált sejthalált a Bim foszforilálásán és mennyiségének csökkentésén keresztül, az Erk útvonalon át [54, 101]. Amíg a BCR és BAFFR közötti együttműködést sokat tanulmányozták, addig a BAFFR és Fas interakciójáról keveset tudni. A TLR9 receptornak a veleszületett és az adaptív immunválaszban is fontos szerep tulajdonítható. CpG hatására a nyugvó B-sejtek 95%-a aktiválódik [61-64]. A TLR9 és BCR szinergisztikusan aktiválja a B-sejteket [65]. A következmény hiper MAPK aktiváció és NF- κ B válasz [65], ezáltal a CpG elősegítheti a specifikus B-sejtek aktivációját, de egyúttal csökkenti az aktivációs küszöböt, növeli az autoantigén specifikus B-sejt válasz lehetőségét [65]. Mivel bizonyos körülmények között a saját DNS is aktiválhatja a TLR9 jelpályát, ez autoimmun betegségek

kialakulásához vezethet [66]. A TLR9-en történő kostimuláció proliferációt és ellenanyagtermelő sejté történő differenciációt okoz [190]. A CpG ODN gátolja a makrofágok szérummegvonással kiváltott apoptózisát [153]. Továbbá kimutatták, hogy a CpG ODN képes megvédeni a B-sejtet és a makrofágot az apoptózistól a PI3K útvonalon keresztül, növelve a Bcl-xl antiapoptotikus fehérje mennyiségét [191]. A CpG hatását a Fas-közvetített sejthalál folyamatokra egy cikk tárgyalja, miszerint primer egér sejtekben a CpG kezelés megvédi a CD40-en keresztül stimulált B-sejteket a CD4+ T-sejt indukált Fas-közvetített apoptózistól, miközben a B-sejt Fas expressziója lecsökken [53]. Ezidáig a BAFFR- és TLR9-függő megmentést és annak hatását a Fas-közvetített apoptózistól való BCR-közvetített megmentésre nem tanulmányozták. Az antigén specifikus BCR-közvetített és a nem antigén specifikus antiapoptotikus szignálók kooperációja kritikus lehet a germinális centrum folyamataiban, mivel az antigén specifikus és nem antigén specifikus B-sejteknek egyaránt lehetősége lehet a túlélésre, válaszul a BAFF vagy a TLR9 szignálra, valamint a BCR-rel integrálva támogathatják az antigén specifikus B-sejtek túlélését.

Munkánk célja volt, hogy megmutassuk a BAFFR, a TLR9 és a BCR közötti kooperációt a B-sejtek Fas-közvetített apoptózistól való megmentésben, vizsgáljuk ezen együttműködés hatását a B-sejt tolerancia szabályozásában.

SKW6.4 humán B-sejtvonalon végzett kísérleteink főbb eredményei a következők: Hosszútávú (24 órás) BAFFL-dal történő aktiválás kis mértékben ugyan, de szignifikánsan megment a Fas-közvetített apoptózistól. A BAFFL nincs hatással az anti-BCR-rel kiváltott túlélésre, ami azt is jelentheti, hogy a BAFF a nem antigén specifikus B-sejtek túlélését támogatja a germinális centrumban. Ez egy potenciális veszélyforrása lehet az autoimmun sejtek kialakulásának, a repertoár bővítésének. Az anti-IgM-hez hasonlóan BAFFL hatására sem változik a Fas receptor sejtfelszíni expressziója, nem ezen az útvonalon befolyásolja a BAFF a Fas-közvetített apoptózist. A fehérjeszintézist gátló CHX ugyanúgy, mint az anti-BCR-rel kiváltott megmentést, a BAFFL indukált túlélést is gátolja, azaz új, (apoptózigátló) fehérje szintézise szükséges a Fas-közvetített apoptózistól való megmentéshez.

Annak érdekében, hogy tanulmányozhassuk az azonnali protektív hatását a BAFFR- és TLR9-közvetített szignálnak a Fas-közvetített sejthalálra, A20 sejtvonalat használtunk, mely ideális célsejtként szolgált a fehérjeszintézistől független túlélő szignálok tanulmányozására gyors Fas-közvetített apoptózis kinetikája miatt [184]. Ahogy azt vártuk, a BCR-közvetített jel az A20 sejtek nagy részében Fas rezisztenciát okoz. A

BAFF kismértékű, de szignifikáns megmentést indukál a Fas-közvetített apoptózissal szemben. A BAFF növeli a BCR-közvetített apoptózistól való megmentés mértékét, melyet tovább fokoz a CpG ODN jelenléte, a TLR9 szigál. Ezen eredmény szerint ezek a túlélő faktorok valószínűleg különböző útvonalakon mentik meg a B-sejtet a Fas-közvetített apoptózistól. Mindeközben a Fas receptor sejtfelszíni expressziója nem változik. Már korábban publikálták, hogy a CpG ODN gátolja az anti-IgM-közvetített apoptózist WEHI 231 éretlen eger B limfóma sejtekben, mely megmentés független a PKC-tól [192]. Neutrofilekben a p38 MAPK direkt foszforilálja a kaspáz-8 és kaspáz-3 proteázokat, és így meggátolja az apoptózist [193]. Ezért specifikus inhibitor használatával megnéztük, hogy a p38 felelős-e a CpG anti-apoptotikus hatásáért. A p38 inhibitor nincs hatással az anti-IgG indukált túlélésre, viszont csökkenti a CpG által kiváltott megmentést A20 sejtekben. Mivel a kaspáz-8 és -3 a p38 direkt szubsztrátjai neutrofilekben [193], továbbá a CpG ODN foszforilálja és aktiválja a p38-at (nem mutatott adat) A20 sejtekben, így úgy gondoljuk, hogy a CpG a p38-on keresztül, a kaspáz-8 és -3 inaktiválásával gátolja a Fas-közvetített apoptózist. Monitoroztuk a kaspáz-8 aktivitását miközben CpG ODN-dal vagy anti-IgG-vel kezeltük a sejteket az anti-Fas előtt. Eredményeink szerint ezen stimulusok csökkentik a kaspáz-8 aktivitást (nem mutatott adat). Mivel a p38 gátlásának nem volt hatása az anti-BCR indukált Fas-közvetített apoptózis elleni védelemre, az anti-IgG-vel kezelt A20 sejtekben a kaspáz-8 aktiváció csökkenése más módon történik. (DISC asszociáció szabályozása, kaspáz-8 foszforilációja más kinázok, pl. src-k által.) A BCR-közvetített védelem az anti-Fas indukált apoptózissal szemben nem gátolható p38 inhibitorral, ez az útvonal PI3K és PKC inhibitorok által gátolható. Bras és társai munkája alapján [186] a BCR-közvetített szignál két túlélő útvonalat indít be a PKC aktiválódást követően. Az egyiket valószínűleg a nem PMA szenzitív PKC segíti, mely inaktiválja a kaspáz kaskádát, a másik a PMA-szenzitív PKC-n keresztül történik, mely fönntartja a normál Bcl-2/Bcl-x szintet. Mivel a mi rendszerünkben fehérjeszintézis nem szükséges a B-sejt túléléshez, az első útvonal tűnik legalább részben felelősnek a BCR-függő Fas rezisztenciának A20 sejtekben. A PKC inhibitor szintén redukálta a CPG ODN indukált túlélést. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a p38 és PI3K specifikus jelpályák mellett van közös mechanizmus is a Fas-közvetített apoptózistól való anti-IgG és CpG indukálta megmentésben a PKC révén.

A több egymás mellett működő túlélő útvonal magyarázhatja az SKW és A20 sejteken megfigyelt, részben eltérő eredményeinket (fehérjeszintézis-függés, BAFF-BCR együttműködésében megfigyelt eltérések).

Elmondhatjuk tehát, hogy a BAFF, a CpG, mint nem antigén specifikus aktivátorok, és az anti BCR, mint antigén specifikus választ indukáló molekula, a B-sejtek számára túlélő szignált biztosítanak a Fas-közvetített apoptózist megakadályozva, valamint, hogy A20 sejteken egymás hatását erősítik. Összességében bizonyítottuk, hogy a BAFF receptorok és a TLR9 is szerepet játszhatnak a B-sejtek túlélésének szabályozásában a Fas-közvetített apoptózis gátlásán keresztül.

Tanulmányunk másik részében részletesen jellemeztük a különböző eredetű szekretált vezikula által indukált sejthalál útvonalat. Az aktivált és potenciálisan autoreaktív T-sejtek aktiváció indukált sejthalála megtörténhet a sejtfelszíni Fas és az ugyanazon vagy más aktivált T sejtek felszínén megjelenő FasL kapcsolatok kialakuló apoptotikus szignálok által [108-110]. A direkt sejt-sejt kontaktus által közvetített sejthalál mellett a szekretált vezikula is rendelkezik citotoxikus funkcióval. Érdekes, hogy hosszú idejű sejt kultúrák esetében kísérletek bizonyítják, hogy a T-sejtek AICD-je lezajlik Fas-függő [108-110] és Fas-független [115-119, 194] módon egyaránt. A felülúszó által kiváltott sejthalálban is fontos szerepet tulajdonítanak a Fas-nak és a FasL-nak [165, 167, 168, 170-173]. Összehasonlítva a sejt-sejt kontaktus és a felülúszó által indukált sejthalált azt találtuk, hogy 1) a felülúszó olyan mechanizmuson keresztül indukál sejthalált, amely különbözik a sejt-sejt kapcsolatot követő sejtpusztító folyamattól, 2) bár mindkét stimulus indukál Fas-függő apoptózist, a Vsec által kiváltott apoptózis enzimatikusan és molekulárisan különbözik a sejt felszínén expresszálandó FasL-dal okozott apoptózistól, 3) a felülúszó, szemben a sejtfelszíni FasL-dal, képes Fas-független nem apoptotikus sejthalál kiváltására, 4) eredményeink szerint a különböző sejtektől (PBMC, Jurkat, DC) származó felülúszók részben hasonló és részben különböző tulajdonsággal bírnak.

A szekretált vezikula indukált, Fas-közvetített apoptózis különleges karakterisztikával bír, mely megkülönbözteti a klasszikus keresztkötött rekombináns FasL, anti-Fas ellenanyag és co-culture által kiváltott apoptózistól. A Vsec indukált apoptózis részlegesen gátlható katepszin D inhibitorral, mutatva az enzimátikus különbséget, szükséges hozzá a RIP1 fehérje jelenléte, valamint FADD hiányában csak részben blokkolható abban az esetben, ha a felülúszó Jurkat T-sejttől származik, jelezve a különböző molekuláris mechanizmust. Co-culture kísérleteinkkel demonstráltuk, hogy a

FasL membránban lokalizációja önmagában nem elég a RIP1-közvetített apoptózishoz [163], a RIP1 csak a felülűszó által indukált sejthalál szabályozásában vesz részt. A nekroptózis végbemeneteléhez alapvetően szükséges a kaspázok hiánya vagy gátlása, ami normál körülmények között csökkenti az *in vivo* előfordulását. Ezáltal a nekroptózis útvonala az apoptózis egy támaszának is tekinthető a T-sejtek eliminációjában [145]. A RIP1-nek a sejthalál receptor indukált nekroptotikus folyamatban betöltött szerepe mellett eredményeink rávilágítottak a RIP1 funkciójára a Fas-közvetített apoptózisban. Ez a fajta apoptotikus sejthalál csak felülűszó indukció hatására jelenik meg.

Míg munkánk során részletesen karakterizáltuk a Vsec által indukált Fas-közvetített apoptózist, a Fas-független nem apoptotikus sejthalál útvonal pontos mechanizmusa további vizsgálatokat igényel. Bemutattuk, hogy ez a nem apoptotikus sejthalál folyamat végbemegy azokban a sejtekben, melyekben hiányzik a Fas, a FADD, a kaspáz-8, a kaspáz-9 (a kaspáz-9 szükséges amennyiben felülűszót PBMC termeli) és a RIP1 molekula, valamint, hogy a kaspázok és a katepszin D sem szükségesek ehhez az útvonalhoz. Morfológiailag vizsgálva a felülűszó indukált sejthalált azt találtuk, hogy ez a folyamat nem okoz DNS fragmentációt. Kíváncsiak voltunk más alapvető mechanizmus, mint a perforin-granzyme rendszer működésére is, de concanamycin és a kalcium kelátor EGTA, amik az irodalom szerint gátolják a perforinon alapuló citotoxikus aktivitást, nem blokkolták a Vsec által kiváltott sejthalált (nem mutatott adat). A szerin proteáz inhibitornak, a PMSF-nek, szintén nem volt hatása a felülűszó pusztító kapacitására, kizárva ezzel a granzyme szerepét a nem apoptotikus folyamatban. Más tesztelt inhibitorok, mint a RIP1 kináz inhibitor, a katepszin B inhibitor, a JNK inhibitor, a NOS inhibitor, a poli(ADP-ribóz) polimeráz inhibitor nem gátolták a felülűszó indukált sejthalált (nem mutatott adat). A RIP1 és a kaspáz-8 hiánya (amikor a felülűszót a FasL-dal overexpresszált Jurkat sejt termelte) csak kis mértékben ugyan, de csökkentette a membránintegritás elvesztését.

Bemutattuk, hogy a különböző primer sejtek egyaránt funkcionálhatnak élő, illetve target sejtként is. A frissen szeparált és PHA-val előaktivált PBMC is hatásos Vsec termelő sejt, a mandulából származó limfociták nem mutattak ilyesfajta aktivitást. Érdekes, hogy a frissen szeparált PBMC rezisztens a felülűszó citotoxikus aktivitására, az előaktivált PBMC és a mandula sejtek ezzel ellentétben szenzitívek, Vsec stimulusra elpusztulnak. Összehasonlítottuk a FasL-dal overexpresszált Jurkat T-sejtből és a PBMC-ből származó felülűszók által indukált sejthalált. A kísérletek alapján elmondhatjuk, hogy mindkét sejtípussal termeltetett felülűszó indukál sejthalált, mely

sejthalál részben hasonló, részben különböző tulajdonsággal bír. Különbség, hogy amíg az aktivált FasL-dal overexpresszált Jurkat T-sejt felülűszojával előidézett sejthalál végbemegy FADD és kaszpáz-9 fehérjék hiányában is, addig a PBMC-vel termeltetett felülűszoval kiváltott sejtpusztításhoz, apoptózishoz mindkét molekula jelenléte szükséges. Ahogy különböző szignálokat indukáló vezikulákról már írtak [195], vizsgálataink alapján indokolt elfogadni, hogy a PHA-val aktivált PBMC és Jurkat sejt felülűszoja molekulárisan különböző összetételű vezikulákat tartalmaz, mely hatással lehet a Fas indukált és Fas-független sejthalál szignálokra. Kísérleteink szerint az aktivált éretlen dendritikus sejt felülűszoja is pusztító hatású, viszont ebben az esetben ultracentrifugálást követően a pellet és az új felülűszo is rendelkezik citotoxikus tulajdonsággal, valamint a Jurkat felülűszoval ellentétben az iDC-ből származó felülűszo sejtpusztító hatása TNFR1-függő. A különböző módon aktivált primer sejtek felülűszo sejtpusztító hatásának analizálása nagyobb rálátást fog szolgáltatni a szekretált vezikula hatására fiziológiás körülmények között. A jelenlegi bizonyítékok szerint az immunrendszer által közvetített sejthalál mechanizmusok nagymértékben eltérhetnek egymástól. A nekroptózis és inhibitora hatásának leírása a tumorterápiában [196] felhívja a figyelmet az újonnan felfedezett sejthalál útvonal fontosságára a rák elleni harcban. Eredményeink, miszerint a Vsec által stimulált jelpálya egy különleges, eddig nem leírt Fas-közvetített apoptózist és egy speciális nem apoptotikus sejthalált indukál, megerősítik a szekretált vezikula komponensei további tanulmányozásának fontosságát. Az általunk használt rendszerben a szekretált vezikula által indukált sejthalál Fas-függő apoptotikus része RIP1-függő is, azaz a RIP1 szükséges jelenléte egy alapvető tulajdonsága a vezikula indukált apoptózisnak, tekintet nélkül a vezikula összetételére és a módszerre, amivel a vezikulát előállítottuk. Összességében direkt bizonyítékot adtunk arra, hogy a szekretált vezikula indukált Fas-közvetített apoptózis enzimatis és molekuláris szinten különbözik a sejt felszíni FasL által okott apoptózistól. Úgy gondoljuk, hogy a sejt-sejt kontaktus révén kiváltott Fas-közvetített sejthalál mellett a szekretált vezikula indukált jelátvitel is okozhat fiziológiás körülmények között fontos sejthalált.

7. Összefoglalás

A többsejtű szervezetek homeosztázisának, az immunrendszer egyensúlyának fenntartásában nélkülözhetetlen a programozott sejthalál folyamata. A Fas sejthalálreceptor részt vesz többek között a T-sejtek aktiváció indukált sejthalál folyamatainak szabályozásában és az érett B-limfocita készlet kialakításában is.

A nem specifikus vagy autoreaktív B-sejtek szelekciójában nélkülözhetetlen a Fas-közvetített apoptózis. Fas hiányában autoimmun folyamatok alakulnak ki, köztük a B-sejt függő mechanizmusok, mint megnövekedett ellenanyag és autoantitest termelés. A már ismert túlélő szignál mellett fontosnak tartottuk megvizsgálni, hogy a BAFFR-on és TLR9-en érkező túlélő jelek milyen hatással vannak a B-sejtek Fas indukált apoptózisára. Kimutattuk, hogy a BAFF és a CpG ODN egyaránt csökkenti a Fas közvetített apoptózist, valamint erősíti a BCR-on keresztüli túlélő szignálokat, ezáltal egyaránt fokozva a nem antigén specifikus és antigén specifikus B-sejtek túlélését.

A direkt sejt-sejt kontaktus által közvetített sejthalál mellett a szekretált vezikula is rendelkezik citotoxikus funkcióval. Eredményeink alapján a felülúszó indukált sejthalál mind enzimatikusan, mind molekulárisan, mind morfológiailag különbözik a rekombináns FasL vagy a sejt-sejt kapcsolat hatására kialakuló FasL-Fas által indukált citotoxicitástól. Kimutattuk, hogy a szekretált vezikulum Fas-függő és Fas-független sejthalált is indukál. Fas-független útvonalon keresztül a vezikulum a célsejtek nekrotikus pusztulását okozza, Fas jelenlétében azonban az apoptotikus sejthalál dominál. A vezikulum által indukált apoptózis Fas-függő, de molekulárisan (RIP1-függőnek bizonyult) és enzimatikusan (katepszin D-függő) is eltér a klasszikus Fas-közvetített apoptózistól. Kimutattuk, hogy egyes sejtípusok, mint a Jurkat T-sejtvonal, a PBMC, vagy a DC sejtek egyaránt képesek citotoxikus felülúszó termelésére, melyek részben átfedő, részben eltérő típusú sejthalált indukálnak.

Az általunk újonnan leírt sejthalál útvonalak terápiás célpontok lehetnek az apoptózis rezisztens tumorok elpusztításában.

Összességében bizonyítottuk, hogy a BAFF receptorok és a TLR9 is szerepet játszhatnak a B-sejtek túlélésének szabályozásában a Fas-közvetített apoptózis gátlásán keresztül, valamint kísérleteink alapján úgy gondoljuk, hogy a sejt-sejt kontaktus révén kiváltott FasL-Fas kapcsolat által közvetített sejthalál mellett a szekretált vezikula indukált citotoxicitás is lényeges szerepet játszhat az immunválasz szabályozásában.

8. Summary

Programmed cell death is essential in the maintenance of multicellular organizations' homeostasis and balance of immune system. The Fas cell death receptor participates in the regulation of activation-induced cell death and the formation of matured B-cells set.

Fas-mediated apoptosis is necessary for the selection of nonspecific and autoreactive B-cells. In the absence of Fas, autoimmune processes develop, like B-cell dependent mechanisms, as increased antibodies and auto-antibodies production. Besides the already known survival signals, it was important to investigate how BAFFR and TLR9 signals influence Fas-mediated apoptosis in B-cells. We detected that both BAFF and CpG ODN reduce Fas-induced apoptosis, and enhance BCR-mediated survival signal, thereby boosting non antigen-specific and antigen-specific survival response in B-cells.

Besides cell death based on direct cell-cell contact, secreted vesicles have cytotoxic function. On the basis of our results, supernatant induced cell death enzymatically, molecularly and morphologically differs from recombinant FasL and co-culture induced cytotoxicity. We found that secreted vesicle can induce both Fas dependent and Fas independent cell death. Secreted vesicles cause necrotic death in Fas negative target cells, but in the presence of Fas the apoptotic cell death dominates. Vesicle induced apoptosis is Fas dependent, but molecularly (RIP dependent) and enzymatically (cathepsin D dependent) differs from the classical Fas-mediated apoptosis. Our results indicate that Jurkat T-cell line, PBMC and dendritic cells can produce cytotoxic supernatant, which induce a partly different and partly the same type of cell death.

This newly discovered cell death pathway can serve as therapeutic targets to induce the killing of apoptosis resistant tumors.

Taking together, in the first part of our work we proved that BAFFR and TLR9 can play a role in the regulation of B-cells survival through the inhibition of Fas-mediated apoptosis. Based on the second part of our investigations we suggest that besides cell-cell contact induced, Fas-FasL contact mediated cell death, secreted vesicle induced cytotoxicity may play an important role in the regulation of immune system.

9. Irodalomjegyzék

1. Guzman-Rojas, L., et al., *Life and death within germinal centres: a double-edged sword*. Immunology, 2002. 107(2): p. 167-75.
2. van Eijk, M., et al., *Death-receptor contribution to the germinal-center reaction*. Trends Immunol, 2001. 22(12): p. 677-82.
3. Linkermann, A., et al., *Considering Fas ligand as a target for therapy*. Expert Opin Ther Targets, 2005. 9(1): p. 119-34.
4. Muschen, M., et al., *The origin of CD95-gene mutations in B-cell lymphoma*. Trends Immunol, 2002. 23(2): p. 75-80.
5. Scott, F.L., et al., *The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering*. Nature, 2009. 457(7232): p. 1019-22.
6. Kischkel, F.C., et al., *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. EMBO J, 1995. 14(22): p. 5579-88.
7. Medema, J.P., et al., *FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC)*. EMBO J, 1997. 16(10): p. 2794-804.
8. Cleveland, J.L. and J.N. Ihle, *Contenders in FasL/TNF death signaling*. Cell, 1995. 81(4): p. 479-82.
9. Nagata, S., *Apoptosis mediated by the Fas system*. Prog Mol Subcell Biol, 1996. 16: p. 87-103.
10. Sun, C.K. and G. Ju, *[FasL-Fas/APO-1 (CD95) system]*. Sheng Li Ke Xue Jin Zhan, 1997. 28(2): p. 136-8.
11. Krammer, P.H., *The CD95(APO-1/Fas)/CD95L system*. Toxicol Lett, 1998. 102-103: p. 131-7.
12. Peter, M.E. and P.H. Krammer, *Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis*. Curr Opin Immunol, 1998. 10(5): p. 545-51.
13. Liang, Q.L., B.R. Wang, and G.H. Li, *Dcr3 and survivin are highly expressed in colorectal carcinoma and closely correlated to its clinicopathologic parameters*. J Zhejiang Univ Sci B, 2009. 10(9): p. 675-82.
14. Sung, H.Y., et al., *Dcr3 inhibit p53-dependent apoptosis in gamma-irradiated lung cancer cells*. Int J Radiat Biol, 2010. 86(9): p. 780-90.
15. Wang, J., et al., *Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP*. Eur J Immunol, 2000. 30(1): p. 155-63.
16. Hennino, A., et al., *FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis*. J Exp Med, 2001. 193(4): p. 447-58.
17. Ola, M.S., M. Nawaz, and H. Ahsan, *Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis*. Mol Cell Biochem, 2011. 351(1-2): p. 41-58.
18. Kroemer, G. and J.C. Reed, *Mitochondrial control of cell death*. Nat Med, 2000. 6(5): p. 513-9.
19. Sreedhar, A.S. and P. Csermely, *Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review*. Pharmacol Ther, 2004. 101(3): p. 227-57.
20. Beere, H.M., *"The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis*. J Cell Sci, 2004. 117(Pt 13): p. 2641-51.
21. Takayama, S., J.C. Reed, and S. Homma, *Heat-shock proteins as regulators of apoptosis*. Oncogene, 2003. 22(56): p. 9041-7.

22. Watanabe-Fukunaga, R., et al., *Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis*. *Nature*, 1992. 356(6367): p. 314-7.
23. Lenardo, M.J., et al., *ALPS-ten lessons from an international workshop on a genetic disease of apoptosis*. *Immunity*, 2010. 32(3): p. 291-5.
24. Rieux-Laucat, F., et al., *Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity*. *Science*, 1995. 268(5215): p. 1347-9.
25. Fisher, G.H., et al., *Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome*. *Cell*, 1995. 81(6): p. 935-46.
26. Stranges, P.B., et al., *Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity*. *Immunity*, 2007. 26(5): p. 629-41.
27. Hao, Z., et al., *Fas receptor expression in germinal-center B cells is essential for T and B lymphocyte homeostasis*. *Immunity*, 2008. 29(4): p. 615-27.
28. Cohen, P.L. and R.A. Eisenberg, *Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease*. *Annu Rev Immunol*, 1991. 9: p. 243-69.
29. Shlomchik, M.J., et al., *The role of B cells in lpr/lpr-induced autoimmunity*. *J Exp Med*, 1994. 180(4): p. 1295-306.
30. Komano, H., et al., *Severe impairment of B cell function in lpr/lpr mice expressing transgenic Fas selectively on B cells*. *Int Immunol*, 1999. 11(7): p. 1035-42.
31. Chu, J.L., et al., *Massive upregulation of the Fas ligand in lpr and gld mice: implications for Fas regulation and the graft-versus-host disease-like wasting syndrome*. *J Exp Med*, 1995. 181(1): p. 393-8.
32. Foote, L.C., et al., *Intracellular signaling for inducible antigen receptor-mediated Fas resistance in B cells*. *J Immunol*, 1996. 157(5): p. 1878-85.
33. Ryu, H.Y., et al., *Environmental chemical-induced bone marrow B cell apoptosis: death receptor-independent activation of a caspase-3 to caspase-8 pathway*. *Mol Pharmacol*, 2005. 68(4): p. 1087-96.
34. Mizuno, T., X. Zhong, and T.L. Rothstein, *Fas-induced apoptosis in B cells*. *Apoptosis*, 2003. 8(5): p. 451-60.
35. Liu, Y.J., O. de Bouteiller, and I. Fugier-Vivier, *Mechanisms of selection and differentiation in germinal centers*. *Curr Opin Immunol*, 1997. 9(2): p. 256-62.
36. Wang, J. and T. Watanabe, *Expression and function of Fas during differentiation and activation of B cells*. *Int Rev Immunol*, 1999. 18(4): p. 367-79.
37. Rathmell, J.C. and C.C. Goodnow, *Autoimmunity. The Fas track*. *Curr Biol*, 1995. 5(11): p. 1218-21.
38. Rothstein, T.L., et al., *Protection against Fas-dependent Th1-mediated apoptosis by antigen receptor engagement in B cells*. *Nature*, 1995. 374(6518): p. 163-5.
39. Wang, J., et al., *Expression and function of Fas antigen on activated murine B cells*. *Eur J Immunol*, 1996. 26(1): p. 92-6.
40. Mandik, L., K.A. Nguyen, and J. Erikson, *Fas receptor expression on B-lineage cells*. *Eur J Immunol*, 1995. 25(11): p. 3148-54.

41. Onel, K.B., et al., *Expression and function of the murine CD95/FasR/APO-1 receptor in relation to B cell ontogeny*. Eur J Immunol, 1995. 25(10): p. 2940-7.
42. Goodnow, C.C., *Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(6): p. 2264-71.
43. Rothstein, T.L., *Inducible resistance to Fas-mediated apoptosis in B cells*. Cell Res, 2000. 10(4): p. 245-66.
44. Catlett, I.M., et al., *Signaling through MHC class II molecules blocks CD95-induced apoptosis*. J Immunol, 2001. 166(10): p. 6019-24.
45. Barrington, R.A., et al., *CD21/CD19 coreceptor signaling promotes B cell survival during primary immune responses*. J Immunol, 2005. 175(5): p. 2859-67.
46. Mongini, P.K., et al., *Role of complement-binding CD21/CD19/CD81 in enhancing human B cell protection from Fas-mediated apoptosis*. J Immunol, 2003. 171(10): p. 5244-54.
47. Cleary, A.M., et al., *Opposing roles of CD95 (Fas/APO-1) and CD40 in the death and rescue of human low density tonsillar B cells*. J Immunol, 1995. 155(7): p. 3329-37.
48. Hennino, A., et al., *Regulation of the Fas death pathway by FLICE-inhibitory protein in primary human B cells*. J Immunol, 2000. 165(6): p. 3023-30.
49. Wang, J. and M.J. Lenardo, *Essential lymphocyte function associated 1 (LFA-1): intercellular adhesion molecule interactions for T cell-mediated B cell apoptosis by Fas/APO-1/CD95*. J Exp Med, 1997. 186(7): p. 1171-6.
50. Schwarz, Y.X., et al., *Follicular dendritic cells protect malignant B cells from apoptosis induced by anti-Fas and antineoplastic agents*. J Immunol, 1999. 163(12): p. 6442-7.
51. Nakanishi, K., et al., *IL-4 and anti-CD40 protect against Fas-mediated B cell apoptosis and induce B cell growth and differentiation*. Int Immunol, 1996. 8(5): p. 791-8.
52. Wurster, A.L., et al., *Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL*. J Biol Chem, 2002. 277(30): p. 27169-75.
53. Wang, Z., et al., *Unmethylated CpG motifs protect murine B lymphocytes against Fas-mediated apoptosis*. Cell Immunol, 1997. 180(2): p. 162-7.
54. Craxton, A., et al., *BAFF regulates B cell survival by downregulating the BH3-only family member Bim via the ERK pathway*. J Exp Med, 2005. 202(10): p. 1363-74.
55. Schneider, T.J., et al., *Bcl-x protects primary B cells against Fas-mediated apoptosis*. J Immunol, 1997. 159(10): p. 4834-9.
56. Schneider, T.J., et al., *A novel gene coding for a Fas apoptosis inhibitory molecule (FAIM) isolated from inducibly Fas-resistant B lymphocytes*. J Exp Med, 1999. 189(6): p. 949-56.
57. Schram, B.R. and T.L. Rothstein, *NF-kappa B is required for surface Ig-induced Fas resistance in B cells*. J Immunol, 2003. 170(6): p. 3118-24.
58. Catlett, I.M. and G.A. Bishop, *Cutting edge: a novel mechanism for rescue of B cells from CD95/Fas-mediated apoptosis*. J Immunol, 1999. 163(5): p. 2378-81.
59. Hinshaw, J.A., et al., *B cell receptor signaling mediates immediate protection from Fas-induced apoptosis upstream of caspase activation through an*

- atypical protein kinase C isozyme and de novo protein synthesis. *Eur J Immunol*, 2003. 33(9): p. 2490-500.
60. Moriyama, H. and S. Yonehara, *Rapid up-regulation of c-FLIP expression by BCR signaling through the PI3K/Akt pathway inhibits simultaneously induced Fas-mediated apoptosis in murine B lymphocytes*. *Immunol Lett*, 2007. 109(1): p. 36-46.
 61. Avalos, A.M., L. Busconi, and A. Marshak-Rothstein, *Regulation of autoreactive B cell responses to endogenous TLR ligands*. *Autoimmunity*, 2010. 43(1): p. 76-83.
 62. Kindrachuk, J., et al., *Activation and regulation of toll-like receptor 9: CpGs and beyond*. *Mini Rev Med Chem*, 2008. 8(6): p. 590-600.
 63. Huang, X. and Y. Yang, *Targeting the TLR9-MyD88 pathway in the regulation of adaptive immune responses*. *Expert Opin Ther Targets*, 2010. 14(8): p. 787-96.
 64. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. *Nature*, 2000. 408(6813): p. 740-5.
 65. Chaturvedi, A., D. Dorward, and S.K. Pierce, *The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyperresponses to DNA-containing antigens*. *Immunity*, 2008. 28(6): p. 799-809.
 66. Krieg, A.M. and J. Vollmer, *Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity*. *Immunol Rev*, 2007. 220: p. 251-69.
 67. Theofilopoulos, A.N., et al., *Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity*. *Annu Rev Immunol*, 2005. 23: p. 307-36.
 68. Bergamin, F., et al., *Essential role of antigen-presenting cell-derived BAFF for antibody responses*. *Eur J Immunol*, 2007. 37(11): p. 3122-30.
 69. Litinskiy, M.B., et al., *DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL*. *Nat Immunol*, 2002. 3(9): p. 822-9.
 70. Jegu, G., et al., *Dendritic cells control B cell growth and differentiation*. *Curr Dir Autoimmun*, 2005. 8: p. 124-39.
 71. Craxton, A., et al., *Macrophage- and dendritic cell-dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF*. *Blood*, 2003. 101(11): p. 4464-71.
 72. Goto, T., et al., *Increase in B-cell-activation factor (BAFF) and IFN-gamma productions by tonsillar mononuclear cells stimulated with deoxycytidyl-deoxyguanosine oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) in patients with IgA nephropathy*. *Clin Immunol*, 2008. 126(3): p. 260-9.
 73. Chu, V.T., et al., *In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells*. *J Immunol*, 2007. 179(9): p. 5947-57.
 74. Katsenelson, N., et al., *Synthetic CpG oligodeoxynucleotides augment BAFF- and APRIL-mediated immunoglobulin secretion*. *Eur J Immunol*, 2007. 37(7): p. 1785-95.
 75. Mackay, F. and P. Schneider, *Cracking the BAFF code*. *Nat Rev Immunol*, 2009. 9(7): p. 491-502.
 76. Bossen, C. and P. Schneider, *BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling*. *Semin Immunol*, 2006. 18(5): p. 263-75.
 77. Gross, J.A., et al., *TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease*. *Nature*, 2000. 404(6781): p. 995-9.
 78. Kayagaki, N., et al., *BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF-kappaB2*. *Immunity*, 2002. 17(4): p. 515-24.

79. Liu, Z. and A. Davidson, *BAFF inhibition: a new class of drugs for the treatment of autoimmunity*. Exp Cell Res, 2011. 317(9): p. 1270-7.
80. Khan, W.N., *B cell receptor and BAFF receptor signaling regulation of B cell homeostasis*. J Immunol, 2009. 183(6): p. 3561-7.
81. Shulga-Morskaya, S., et al., *B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation*. J Immunol, 2004. 173(4): p. 2331-41.
82. Levine, M.H., et al., *A B-cell receptor-specific selection step governs immature to mature B cell differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(6): p. 2743-8.
83. Daridon, C., P. Youinou, and J.O. Pers, *BAFF, APRIL, TWE-PRIL: who's who?* Autoimmun Rev, 2008. 7(4): p. 267-71.
84. Yang, M., et al., *Novel function of B cell-activating factor in the induction of IL-10-producing regulatory B cells*. J Immunol, 2010. 184(7): p. 3321-5.
85. Sasaki, Y., et al., *TNF family member B cell-activating factor (BAFF) receptor-dependent and -independent roles for BAFF in B cell physiology*. J Immunol, 2004. 173(4): p. 2245-52.
86. Brink, R., *Regulation of B cell self-tolerance by BAFF*. Semin Immunol, 2006. 18(5): p. 276-83.
87. Khare, S.D., et al., *Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(7): p. 3370-5.
88. Mackay, F., et al., *Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations*. J Exp Med, 1999. 190(11): p. 1697-710.
89. Chan, A.C., *B cell immunotherapy in autoimmunity--2010 update*. Mol Immunol, 2011. 48(11): p. 1344-7.
90. Youinou, P. and J.O. Pers, *The late news on baff in autoimmune diseases*. Autoimmun Rev, 2010. 9(12): p. 804-6.
91. Daridon, C., G.R. Burmester, and T. Dorner, *Anticytokine therapy impacting on B cells in autoimmune diseases*. Curr Opin Rheumatol, 2009. 21(3): p. 205-10.
92. George-Chandy, A., E. Trysberg, and K. Eriksson, *Raised intrathecal levels of APRIL and BAFF in patients with systemic lupus erythematosus: relationship to neuropsychiatric symptoms*. Arthritis Res Ther, 2008. 10(4): p. R97.
93. Groom, J., et al., *Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome*. J Clin Invest, 2002. 109(1): p. 59-68.
94. Batten, M., et al., *BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes*. J Exp Med, 2000. 192(10): p. 1453-66.
95. Thien, M., et al., *Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches*. Immunity, 2004. 20(6): p. 785-98.
96. Claudio, E., et al., *BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells*. Nat Immunol, 2002. 3(10): p. 958-65.
97. Hatada, E.N., et al., *NF-kappa B1 p50 is required for BLyS attenuation of apoptosis but dispensable for processing of NF-kappa B2 p100 to p52 in quiescent mature B cells*. J Immunol, 2003. 171(2): p. 761-8.

98. Mackay, F., et al., *B-cell stage and context-dependent requirements for survival signals from BAFF and the B-cell receptor*. Immunol Rev, 2010. 237(1): p. 205-25.
99. Shinnars, N.P., et al., *Bruton's tyrosine kinase mediates NF-kappa B activation and B cell survival by B cell-activating factor receptor of the TNF-R family*. J Immunol, 2007. 179(6): p. 3872-80.
100. Enzler, T., et al., *Alternative and classical NF-kappa B signaling retain autoreactive B cells in the splenic marginal zone and result in lupus-like disease*. Immunity, 2006. 25(3): p. 403-15.
101. Otipoby, K.L., et al., *BAFF activates Akt and Erk through BAFF-R in an IKK1-dependent manner in primary mouse B cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(34): p. 12435-8.
102. Patke, A., et al., *BAFF controls B cell metabolic fitness through a PKC beta- and Akt-dependent mechanism*. J Exp Med, 2006. 203(11): p. 2551-62.
103. Woodland, R.T., M.R. Schmidt, and C.B. Thompson, *BLyS and B cell homeostasis*. Semin Immunol, 2006. 18(5): p. 318-26.
104. Woodland, R.T., et al., *Multiple signaling pathways promote B lymphocyte stimulator dependent B-cell growth and survival*. Blood, 2008. 111(2): p. 750-60.
105. Castro, I., et al., *B cell receptor-mediated sustained c-Rel activation facilitates late transitional B cell survival through control of B cell activating factor receptor and NF-kappaB2*. J Immunol, 2009. 182(12): p. 7729-37.
106. Stadanlick, J.E., et al., *Tonic B cell antigen receptor signals supply an NF-kappaB substrate for prosurvival BLyS signaling*. Nat Immunol, 2008. 9(12): p. 1379-87.
107. Mountz, J.D., et al., *Defective clonal deletion and anergy induction in TCR transgenic lpr/lpr mice*. Semin Immunol, 1994. 6(1): p. 27-37.
108. Dhein, J., et al., *Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95)*. Nature, 1995. 373(6513): p. 438-41.
109. Brunner, T., et al., *Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas*. Nature, 1995. 373(6513): p. 441-4.
110. Ju, S.T., et al., *Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation*. Nature, 1995. 373(6513): p. 444-8.
111. Brunner, T., et al., *Regulation of CD95 ligand expression: a key element in immune regulation?* Behring Inst Mitt, 1996(97): p. 161-74.
112. Refaeli, Y., et al., *Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis*. Immunity, 1998. 8(5): p. 615-23.
113. Parlato, S., et al., *CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway*. EMBO J, 2000. 19(19): p. 5123-34.
114. Sobel, E.S., et al., *Co-infusion of normal bone marrow partially corrects the gld T-cell defect. Evidence for an intrinsic and extrinsic role for Fas ligand*. J Immunol, 1995. 154(1): p. 459-64.
115. Davidson, W.F., et al., *T cell receptor ligation triggers novel nonapoptotic cell death pathways that are Fas-independent or Fas-dependent*. J Immunol, 2002. 169(11): p. 6218-30.
116. Tucek-Szabo, C.L., et al., *Surface T cell Fas receptor/CD95 regulation, in vivo activation, and apoptosis. Activation-induced death can occur without Fas receptor*. J Immunol, 1996. 156(1): p. 192-200.

117. Radvanyi, L.G., et al., *Interleukin-2 reverses the defect in activation-induced apoptosis in T cells from autoimmune lpr mice*. *Cell Immunol*, 1998. 183(1): p. 1-12.
118. Brenner, D., et al., *Caspase-cleaved HPK1 induces CD95L-independent activation-induced cell death in T and B lymphocytes*. *Blood*, 2007. 110(12): p. 3968-77.
119. Mateo, V., et al., *Perforin-dependent apoptosis functionally compensates Fas deficiency in activation-induced cell death of human T lymphocytes*. *Blood*, 2007. 110(13): p. 4285-92.
120. Beisner, D.R., et al., *The requirements for Fas-associated death domain signaling in mature T cell activation and survival*. *J Immunol*, 2003. 171(1): p. 247-56.
121. Osborn, S.L., et al., *Fas-associated death domain (FADD) is a negative regulator of T-cell receptor-mediated necroptosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(29): p. 13034-9.
122. Ch'en, I.L., et al., *Antigen-mediated T cell expansion regulated by parallel pathways of death*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(45): p. 17463-8.
123. Lens, S.M., et al., *The caspase 8 inhibitor c-FLIP(L) modulates T-cell receptor-induced proliferation but not activation-induced cell death of lymphocytes*. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(15): p. 5419-33.
124. Oberst, A., et al., *Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis*. *Nature*, 2011. 471(7338): p. 363-7.
125. Kaiser, W.J., et al., *RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice*. *Nature*, 2011. 471(7338): p. 368-72.
126. Zhang, H., et al., *Functional complementation between FADD and RIP1 in embryos and lymphocytes*. *Nature*, 2011. 471(7338): p. 373-6.
127. Bossi, G., et al., *Sorting out the multiple roles of Fas ligand*. *Eur J Cell Biol*, 2000. 79(8): p. 539-43.
128. Bell, B.D., et al., *FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(43): p. 16677-82.
129. Schneider, P., et al., *Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity*. *J Exp Med*, 1998. 187(8): p. 1205-13.
130. Bossi, G. and G.M. Griffiths, *Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells*. *Nat Med*, 1999. 5(1): p. 90-6.
131. Kayagaki, N., et al., *Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand*. *J Exp Med*, 1995. 182(6): p. 1777-83.
132. Gyorgy, B., et al., *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles*. *Cell Mol Life Sci*, 2011. 68(16): p. 2667-88.
133. Galluzzi, L., et al., *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. *Cell Death Differ*, 2012. 19(1): p. 107-20.
134. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. *Cell Death Differ*, 2009. 16(1): p. 3-11.
135. Moquin, D. and F.K. Chan, *The molecular regulation of programmed necrotic cell injury*. *Trends Biochem Sci*, 2010. 35(8): p. 434-41.

136. Artal-Sanz, M. and N. Tavernarakis, *Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration*. FEBS Lett, 2005. 579(15): p. 3287-96.
137. Mack, C., et al., *Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(8): p. 3094-9.
138. Tenev, T., et al., *The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs*. Mol Cell, 2011. 43(3): p. 432-48.
139. Ma, Y., et al., *NF-kappaB protects macrophages from lipopolysaccharide-induced cell death: the role of caspase 8 and receptor-interacting protein*. J Biol Chem, 2005. 280(51): p. 41827-34.
140. Kalai, M., et al., *Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA*. Cell Death Differ, 2002. 9(9): p. 981-94.
141. Feoktistova, M., et al., *cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms*. Mol Cell, 2011. 43(3): p. 449-63.
142. Thapa, R.J., et al., *NF-kappaB protects cells from gamma interferon-induced RIP1-dependent necroptosis*. Mol Cell Biol, 2011. 31(14): p. 2934-46.
143. Vanlangenakker, N., et al., *cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production*. Cell Death Differ, 2011. 18(4): p. 656-65.
144. Holler, N., et al., *Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule*. Nat Immunol, 2000. 1(6): p. 489-95.
145. Han, J., C.Q. Zhong, and D.W. Zhang, *Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system*. Nat Immunol, 2011. 12(12): p. 1143-9.
146. Vandenabeele, P., et al., *The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis*. Sci Signal, 2010. 3(115): p. re4.
147. Vanlangenakker, N., T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele, *Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview*. Cell Death Differ, 2012. 19(1): p. 75-86.
148. Cho, Y.S., et al., *Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation*. Cell, 2009. 137(6): p. 1112-23.
149. Degterev, A., et al., *Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury*. Nat Chem Biol, 2005. 1(2): p. 112-9.
150. Sun, X., et al., *Identification of a novel homotypic interaction motif required for the phosphorylation of receptor-interacting protein (RIP) by RIP3*. J Biol Chem, 2002. 277(11): p. 9505-11.
151. Ermolaeva, M.A., et al., *Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses*. Nat Immunol, 2008. 9(9): p. 1037-46.
152. He, S., et al., *Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha*. Cell, 2009. 137(6): p. 1100-11.
153. Li, H., et al., *Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation*. J Biol Chem, 2006. 281(19): p. 13636-43.

154. Laukens, B., et al., *Smac mimetic bypasses apoptosis resistance in FADD- or caspase-8-deficient cells by priming for tumor necrosis factor alpha-induced necroptosis*. *Neoplasia*, 2011. 13(10): p. 971-9.
155. Wang, L., F. Du, and X. Wang, *TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways*. *Cell*, 2008. 133(4): p. 693-703.
156. O'Donnell, M.A., et al., *Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD*. *Nat Cell Biol*, 2011. 13(12): p. 1437-42.
157. Lin, Y., et al., *Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis*. *Genes Dev*, 1999. 13(19): p. 2514-26.
158. Moquin, D. and F.K. Chan, *The molecular regulation of programmed necrotic cell injury*. *Trends Biochem Sci*. 35(8): p. 434-41.
159. Ting, A.T., F.X. Pimentel-Muinos, and B. Seed, *RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis*. *Embo J*, 1996. 15(22): p. 6189-96.
160. Kelliher, M.A., et al., *The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal*. *Immunity*, 1998. 8(3): p. 297-303.
161. Li, L., et al., *A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNFalpha-mediated cell death*. *Science*, 2004. 305(5689): p. 1471-4.
162. Barcia, R.N., N.S. Valle, and J.D. McLeod, *Caspase involvement in RIP-associated CD95-induced T cell apoptosis*. *Cell Immunol*, 2003. 226(2): p. 78-85.
163. Morgan, M.J., Y.S. Kim, and Z.G. Liu, *Membrane-bound Fas ligand requires RIP1 for efficient activation of caspase-8 within the death-inducing signaling complex*. *J Immunol*, 2009. 183(5): p. 3278-84.
164. Koizumi, T., et al., *Regulation of bcl-xL expression and Fas susceptibility in mouse B cells by CD40 ligation, surface IgM crosslinking and IL-4*. *Mol Immunol*, 1996. 33(16): p. 1247-53.
165. Martinez-Lorenzo, M.J., et al., *Release of preformed Fas ligand in soluble form is the major factor for activation-induced death of Jurkat T cells*. *Immunology*, 1996. 89(4): p. 511-7.
166. Martinez-Lorenzo, M.J., et al., *Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells*. *Eur J Immunol*, 1998. 28(9): p. 2714-25.
167. Martinez-Lorenzo, M.J., et al., *Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles*. *J Immunol*, 1999. 163(3): p. 1274-81.
168. Jodo, S., et al., *CD95 (Fas) ligand-expressing vesicles display antibody-mediated, FcR-dependent enhancement of cytotoxicity*. *J Immunol*, 2000. 165(10): p. 5487-94.
169. Jodo, S., et al., *Apoptosis-inducing membrane vesicles. A novel agent with unique properties*. *J Biol Chem*, 2001. 276(43): p. 39938-44.
170. Monleon, I., et al., *Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells*. *J Immunol*, 2001. 167(12): p. 6736-44.
171. Andreola, G., et al., *Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles*. *J Exp Med*, 2002. 195(10): p. 1303-16.
172. Alonso, R., et al., *A new role of diacylglycerol kinase alpha on the secretion of lethal exosomes bearing Fas ligand during activation-induced cell death of T lymphocytes*. *Biochimie*, 2007. 89(2): p. 213-21.

173. Alonso, R., et al., *Diacylglycerol kinase alpha regulates the secretion of lethal exosomes bearing Fas ligand during activation-induced cell death of T lymphocytes*. J Biol Chem, 2005. 280(31): p. 28439-50.
174. Bosque, A., et al., *Down-regulation of normal human T cell blast activation: roles of APO2L/TRAIL, FasL, and c- FLIP, Bim, or Bcl-x isoform expression*. J Leukoc Biol, 2005. 77(4): p. 568-78.
175. Klas, C., et al., *Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells*. Int Immunol, 1993. 5(6): p. 625-30.
176. Suss, G. and K. Shortman, *A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis*. J Exp Med, 1996. 183(4): p. 1789-96.
177. Zitvogel, L., et al., *Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes*. Nat Med, 1998. 4(5): p. 594-600.
178. Joo, H.G., et al., *Human dendritic cells induce tumor-specific apoptosis by soluble factors*. Int J Cancer, 2002. 102(1): p. 20-8.
179. Janjic, B.M., et al., *Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. Involvement of an apoptosis-inducing pathway*. J Immunol, 2002. 168(4): p. 1823-30.
180. Lu, G., et al., *Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotoxin-alpha(1)beta(2), Fas ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand*. J Immunol, 2002. 168(4): p. 1831-9.
181. Rathmell, J.C., et al., *CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells*. Nature, 1995. 376(6536): p. 181-4.
182. Adachi, M., et al., *Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(5): p. 2131-6.
183. Schattner, E.J., et al., *CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway*. J Exp Med, 1995. 182(5): p. 1557-65.
184. Carey, G.B., et al., *B-cell receptor and Fas-mediated signals for life and death*. Immunol Rev, 2000. 176: p. 105-15.
185. Zhang, X., et al., *Up-regulation of Bcl-xL expression protects CD40-activated human B cells from Fas-mediated apoptosis*. Cell Immunol, 1996. 173(1): p. 149-54.
186. Bras, A., A.C. Martinez, and E. Baixeras, *B cell receptor cross-linking prevents Fas-induced cell death by inactivating the IL-1 beta-converting enzyme protease and regulating Bcl-2/Bcl-x expression*. J Immunol, 1997. 159(7): p. 3168-77.
187. Gomez-Angelats, M. and J.A. Cidlowski, *Protein kinase C regulates FADD recruitment and death-inducing signaling complex formation in Fas/CD95-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2001. 276(48): p. 44944-52.
188. Mackay, F. and J.L. Browning, *BAFF: a fundamental survival factor for B cells*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(7): p. 465-75.
189. Cancro, M.P., *Signalling crosstalk in B cells: managing worth and need*. Nat Rev Immunol, 2009. 9(9): p. 657-61.
190. de Alboran, I.M., et al., *Cell death during lymphocyte development and activation*. Semin Immunol, 2003. 15(3): p. 125-33.
191. Kuo, C.C., S.M. Liang, and C.M. Liang, *CpG-B oligodeoxynucleotide promotes cell survival via up-regulation of Hsp70 to increase Bcl-xL and to decrease apoptosis-inducing factor translocation*. J Biol Chem, 2006. 281(50): p. 38200-7.

192. Macfarlane, D.E., L. Manzel, and A.M. Krieg, *Unmethylated CpG-containing oligodeoxynucleotides inhibit apoptosis in WEHI 231 B lymphocytes induced by several agents: evidence for blockade of apoptosis at a distal signalling step*. Immunology, 1997. 91(4): p. 586-93.
193. Alvarado-Kristensson, M., et al., *p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils*. J Exp Med, 2004. 199(4): p. 449-58.
194. Watanabe, N., et al., *Th1 and Th2 subsets equally undergo Fas-dependent and -independent activation-induced cell death*. Eur J Immunol, 1997. 27(8): p. 1858-64.
195. Kassahn, D., et al., *Distinct requirements for activation-induced cell surface expression of preformed Fas/CD95 ligand and cytolytic granule markers in T cells*. Cell Death Differ, 2009. 16(1): p. 115-24.
196. Degterev, A., et al., *Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins*. Nat Chem Biol, 2008. 4(5): p. 313-21.

10. Publikációs lista

Az értekezés témájához kapcsolódó saját közlemények

Hancz A, Hérincs Z, Neer Z, Sármay G, Koncz G. Integration of signals mediated by B-cell receptor, B-cell activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) and Fas (CD95). Immunol Lett. 2008 Mar 15;116(2):211-7.

IF: 2,858

Hancz A, Koncz G, Szili D, Sármay G. TLR9-mediated signals rescue B-cells from Fas-induced apoptosis via inactivation of caspases. Immunol Lett. 2012 Mar 30;143(1):77-84.

IF: 2,511

Gábor Koncz, **Anikó Hancz**, Krittalak Chakrabandhu, Péter Gogolák, Krisztina Kerekes, Éva Rajnavölgyi, Anne-Odile Hueber. Vesicles released by activated T cells induce both Fas-mediated RIP-dependent apoptotic and Fas-independent non-apoptotic cell deaths. (under revision)

Absztraktok, előadások, posztterek

Membrántranszport Konferencia 2007, Sümeg

- **A BAFF szerepe a Fas-közvetített jelátviteli útvonalak szabályozásában**

Hancz Anikó, Hérincs Zoltán, Sármay Gabriella, Koncz Gábor

- **Az SHP1 szerepe a Fas-közvetített sejthalál szabályozásában**

Koncz Gábor, Kerekes Krisztina, Hancz Anikó, Anne Odile Hueber

Magyar Immunológiai Társaság Vándorgyűlése 2007, Hajdúszoboszló

- **A BAFF szerepe a Fas-közvetített jelátviteli útvonalak szabályozásában**

Hancz Anikó, Hérincs Zoltán, Sármay Gabriella, Koncz Gábor

Magyar Biokémia Egyesület Vándorgyűlése 2009, Budapest

- **Egy új Fas-indukált jelpálya jellemzése**

Koncz Gábor, Hancz Anikó, Kerényi Orsolya, Anne-Odile Hueber

International PhD day 2009, Budapest

- **Characterization of a new Fas-induced signal transduction pathway**

Anikó Hancz, Gábor Koncz, Orsolya Kerényi, Anne-Odile Hueber

15th efs-EJI Symposium on SIGNALS AND SIGNAL PROCESSING IN THE IMMUNE SYSTEM 2009, Balatonöszöd

- **Integration of signals mediated by B-cell receptor, B-cell activating factor belonging to the tumornecrosis factor family (BAFF), the Toll-like receptor 9 (TLR9) agonist, CpG DNA and Fas(CD95)**

Anikó Hancz, Zoltán Hérincs, Gábor Koncz and Gabriella Sármay

- **The role of RIP in Fas-mediated cell death**

Gábor Koncz, Anikó Hancz, Kerényi Orsolya, Anne-Odile Hueber

2nd European Congress of Immunology 2009, Berlin

- **Integration of signals mediated by B-cell receptor, B-cell activating factor belonging to the tumornecrosis factor family (BAFF), the Toll-like receptor 9 (TLR9) agonist, CpG DNA and Fas(CD95)**

Anikó Hancz, Zoltán Hérincs, Gábor Koncz and Gabriella Sármay

Magyar Immunológiai Társaság Vándorgyűlése 2010, Szeged

- **A túlélést segítő és a Fas-közvetített sejthalált kiváltó jelek integrációja**

Anikó Hancz, Gábor Koncz, Gabriella Sármay

- **Egy új – Fas ligandot hordozó vezikula által indukált – sejthalál forma jellemzése**

Anikó Hancz, Gábor Koncz, Anne-Odile Hueber

14th International Congress of Immunology 2010, Kobe

- **Signal integration in B-cells: consequences on selection and survival**

Gabriella Sármay, Dániel Szili, Anikó Hancz, Gábor Koncz, Zoltán Hérincs, Melinda Simon, Dorottya Kövesdi, Judit Pozsgay

Universitates Nostrae – Scientia Nostra 2010, Budapest

- **A túlélést segítő és a Fas-közvetített sejthalált kiváltó jelek integrációja**

Anikó Hancz, Gábor Koncz, Gabriella Sármay

- **Signal integration in B-cells: consequences on selection and survival**

Gabriella Sármay, Dániel Szili, Anikó Hancz, Gábor Koncz, Zoltán Hérincs, Melinda Simon, Dorottya Kövesdi, Judit Pozsgay

31st European Workshop for Rheumatology Research 2011, Amsterdam

- **Cooperation between signaling pathways leading to survival, proliferation or death of human B-cells**

Dániel Szili, Anikó Hancz, Zoltán Hérincs, Gábor Koncz, Gabriella Sármay

41. Membrántranszport konferencia 2011, Sümeg

- **Szekretált vezikula által indukált sejthalál útvonalak jellemzése**

Anikó Hancz, Gogolák Péter, Rajnavölgyi Éva, Anne-Odile Hueber, Gábor Koncz

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönet illeti Prof. Dr. Erdei Annát, hogy az ELTE Immunológiai Tanszékén végezhettem el a PhD iskolát.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Sármay Gabriellának segítségéért, szakmai tanácsaiért, támogatásáért. Nagyon köszönöm témavezetőmnek, Dr. Koncz Gábornak, hogy mind szakmailag, mind emberileg segített nekem, és irányította munkámat, s hogy mindig vidáman léptem be a laborba.

Továbbá köszönöm Izsépi Emesének, Herbáth Melindának, Kremlitzka Mariannak és Farkas Anitának, hogy vidám hangulatban teltek a napok, hogy bármivel fordulhattam hozzájuk.

Köszönet illeti Mártit és Süsüt, hogy segítették munkámat.

Köszönettel tartozom a Jelátvitel labornak, a Tanszéken sürgű-forgó dolgozóknak, diákoknak, barátoknak, hogy fordulhattam hozzájuk segítségért, hogy jó hangulatban telt el az itt töltött idő.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak, barátaimnak, ismerőseimnek a támogatásukat, hogy mellettem álltak ez idő alatt.